GE Healthcare

Biacore T100

日本語取扱説明書

GE imagination at work

71-3053-32

目次

1. セットアップ 1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動 1

1-1-1. 電源の立ち上げ 1

1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット 2

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動 4

1-2. システムの初期化 5

1-2-1. センサーチップの挿入 5

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化 9

1-2-3. 温度設定 10

1-2-4. 試料のセットと取り出し 11

2. 基本操作 14

2-1. マニュアル測定の実行方法 15

2-1-1. 試料の添加 17

2-1-2. レポートポイントの追加 19

2-1-3. 測定の終了 20

2-2. ファイルの保存 20

2-3. データの印刷 20

3. 固定化 21

3-1. アミンカップリング法 23

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択 25

3-1-2. 基本プロトコールでの固定化 30

3-1-3. 固定化量を調節して固定化 36

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討 39

5. 相互作用測定 46

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出 47
5-1-1. プログラムの実行 49
5-1-2. カーブフィッティングによる解析 56
5-1-3. 平衡値解析 65

5-2. 濃度測定 69
5-2-1. プログラムの実行 70
5-2-2. データ解析 78

5-3. 結合の有無の確認、スクリーニング 85
5-3-1. プログラムの実行 85
5-3-2. データ解析 92

5-4. 熱力学的パラメータの算出 99
5-4-1. プログラムの実行 101
5-4-2. データ解析 108

5-5. 低分子化合物アナライトの相互作用測定 115
5-5-1. プログラムの実行 118
5-5-2. データ解析 129

5-6. 結合アナライトの回収 137
5-6-1. プログラムの実行 138

6. メソッドによるプログラムの作成 148

6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し 149

6-2. メソッドの編集 150

6-3. メソッドの実行 168

7. メンテナンス 172

7-1. システムの洗浄 175
7-1-1. Desorb 175
7-1-2. Desorb and Sanitize 176
7-1-3. Empty Buffer Tubing 180
7-1-4. Wash Buffer Tubing 181

7-2. シグナルの校正 183
7-2-1. Normalize 183

7-3. システムチェック 184

8. 実験の終了 186

8-1. スタンバイ状態での放置 186

8-2. 電源の落とし方 186

8-3. センサーチップの保存 187

9. センサーグラムの編集 189

9-1. ソフトウェアの起動 189

9-2. ファイルの呼び出し 189

9-3. センサーグラムの編集 191
9-3-1. センサーグラムの選択 191
9-3-2. センサーグラムの表示の変更 193
9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースライン合わせ 193
9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除 194

9-4. グラフの編集 195

9-5. データの移管 197

9-6. データの保存 199

1. セットアップ

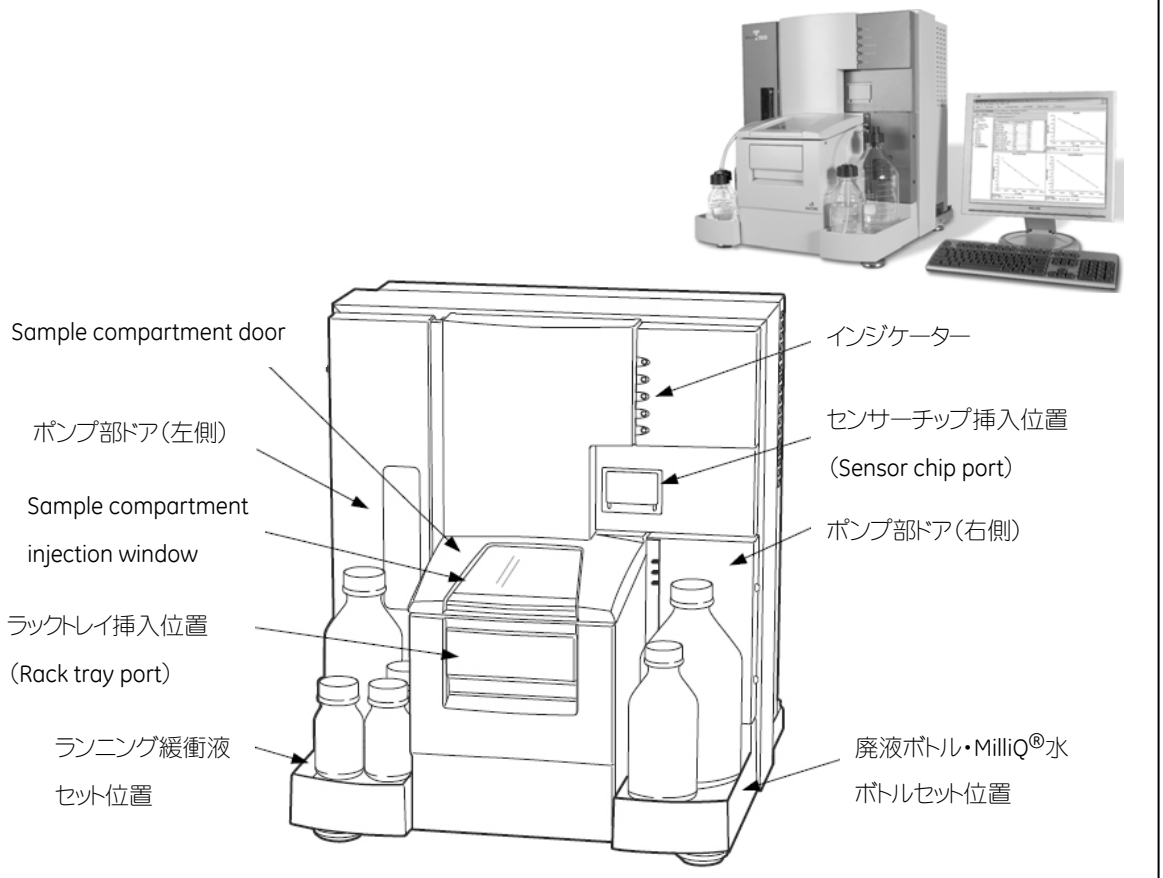
1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。Windows のバージョンにより、パスワード(biacore)の入力が必要な場合がある。

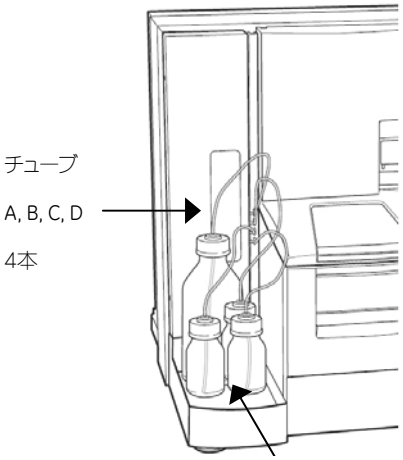
注）装置本体の電源を入れると、本体のフロント右上にあるすべてのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消える。その後 **ready** のインジケーターが点灯し、**temperature** のインジケーターは点滅する。

補足 1-1. 装置の配置

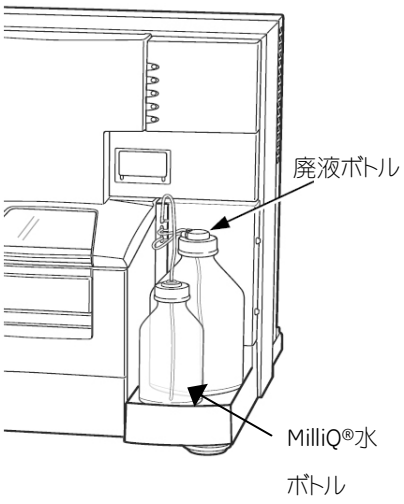


1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット

本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、チューブ A を挿入する。また、右側トレイには、超純水ボトルおよび廃液ボトルをセットして、対応するチューブを挿入する。



左側；ランニング緩衝液ボトルセット



右側；廃液ボトル・MilliQ®水ボトルセット

補足 1-2. チューブの配置

本体左側

チューブ A,B,C,D には、タグがついているので確認する。

チューブ A	ランニング緩衝液ボトルに入れる。
チューブ B,C,D	必要に応じて複数のランニング緩衝液をセットできる。

本体右側

超純水チューブ	超純水を入れた 500 ml ボトルに入れる。
廃液チューブ（2 本）	廃液ボトルキャップに接続する。

補足 1-3. ランニング緩衝液の種類

ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液および PBS 緩衝液を発売している。

HBS-EP+ 10X　（1000 ml, BR-1006-69）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P+ 10X　（1000 ml, BR-1006-71）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N 10X　（1000 ml, BR-1006-70）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

PBS 10X（1000 ml, BR-1006-72）

0.1 M phosphate buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈後、5%(v/v) DMSO を混合

0.01 M phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH7.4

HBS-EP（200 ml, BR-1001-88）

0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P（200 ml, BR-1003-68）

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N（200 ml, BR-1003-69）

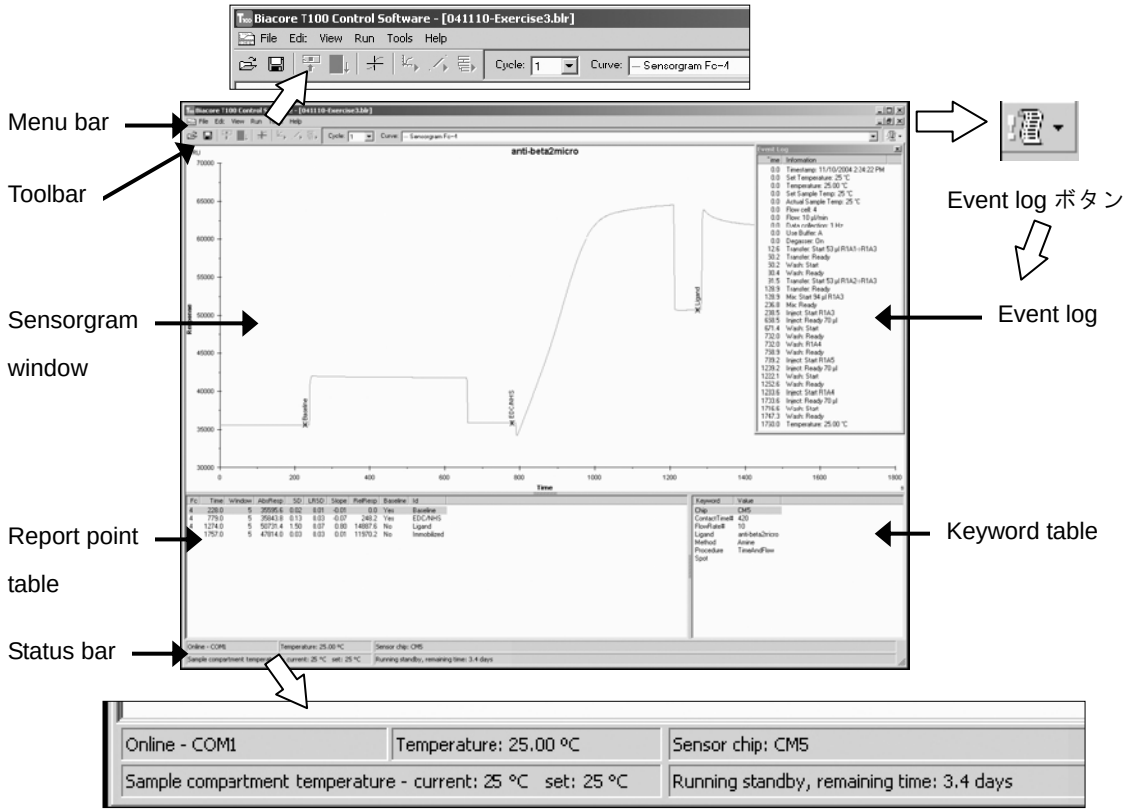
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能であるが、各自で調製する場合には、0.22 um フィルターでろ過を行う。

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下の **Start** から、**BIA programs** → **Biacore T100 Control Software** のアイコンをクリックする。

補足 1-4. 画面の説明

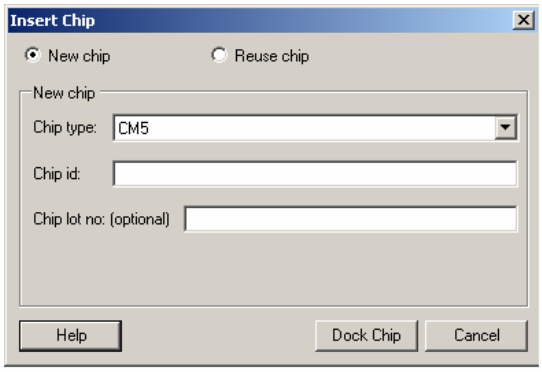


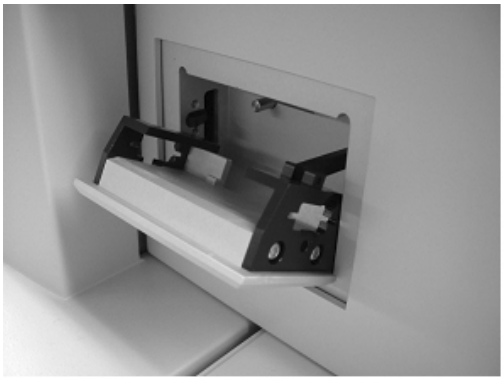
Menu bar	Biacore T100 で実行可能なほとんどの操作コマンドが含まれる。
Toolbar	使用頻度の高いコマンドをアイコン化。簡便にコマンド操作を選択できる。その時点で実行可能なコマンドのみ選択可能。
Sensorgram window	センサーグラムをリアルタイムに表示。
Report point table	任意時間のレスポンスを数値で表示。結合量の算出等に使用。
Event log	測定中の操作内容を表示。
Status bar	現在のシステムの状態を表示。 オンライン状況、システム温度（Temperature）、センサーチップのタイプ、サンプル温度（Sample compartment temperature）、Run 実行状態 など。

1-2. システムの初期化

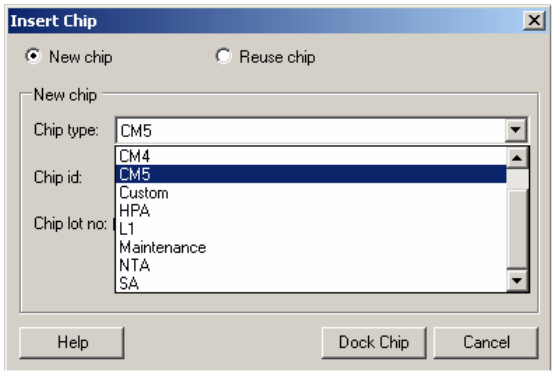
1-2-1. センサーチップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると Insert Chip ダイアログが表示され、同時に T100 本体右側のセンサーチップポートが自動的に開く。





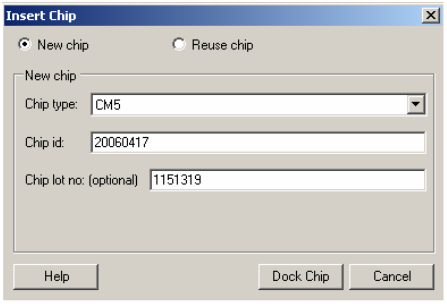
↓



Series S センサーチップ CM5

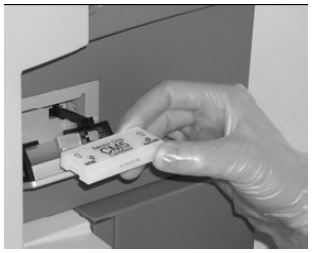
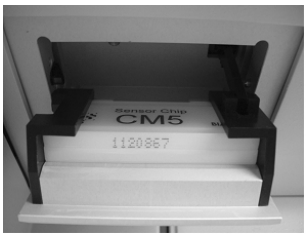
新品のセンサーチップを使用する際は、○**New chip** に、再利用のセンサーチップの場合は、○**Reuse chip** にチェックを入れ、使用する **Chip type** を選択する。（再利用のセンサーチップを使用する場合は、7 ページを参照。）

↓



Chip id を入力する。開封年月日などを入力することが多い。必要に応じて、**Chip lot no (optional)** を入力する。

↓

センサーチップを印字面の両側の矢印の方向でセンサーチップポートに挿入する。センサーチップポートを手で押して閉める。

Insert Chip ダイアログの **Dock Chip** をクリックする。

↓

Dock が完了して自動的に **Standby flow** 状態になる。

Standby flow とは、セットしたランニング緩衝液（チューブ A）を低流速で流し続けるモードである。最長 4 日間継続する。（バッファーの必要量；65 ml/ 24 時間）

補足 1-5. センサーチップ挿入時の注意事項

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。

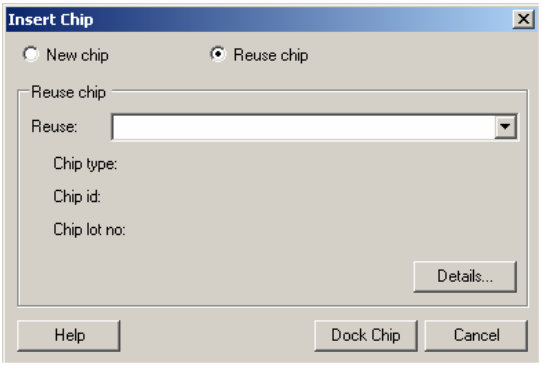
冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻した後に Dock する。

センサーチップポートを閉じてしまった後、センサーチップを取り出す必要がある場合は、一旦 Insert Chip のダイアログを Cancel する。Toolbar の **Eject** アイコン（ ）を選択して、**Eject Chip** をクリックする。

Insert Chip ダイアログを閉じてしまった場合、Toolbar の **Insert** アイコン（ ）を選択すれば、再度ダイアログが表示される。

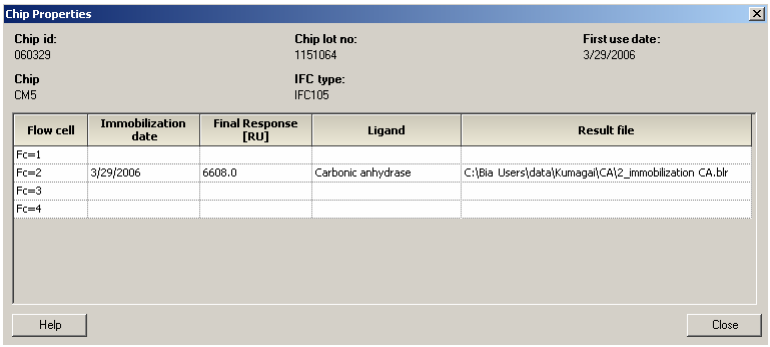
補足 1-6. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、挿入時、**○Reuse chip** にチェックを入れると下記のダイアログが表示される。



↓

Reuse:で、そのセンサーチップに対応した id 番号を選択し、Details...をクリックすると、固定化履歴が表示される。



確認後、**Close** をクリックする。

センサーチップを取り出して保存する場合は、センサーチップカバーに id を書き込むと、次回使用する際に id を選択しやすい。

補足 1-7. センサーチップの種類

各センサーチップの詳細は弊社総合カタログ等を参照する。

カルボキシル基タイプ（タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化）

Series S Sensor Chip CM5	3 枚	BR-1006-68
Series S Sensor Chip CM5 Certified	3 枚	BR-1005-30
Series S Sensor Chip CM4 Certified	3 枚	BR-1005-34
Series S Sensor Chip CM3 Certified	3 枚	BR-1005-36
Series S Sensor Chip C1 Certified	3 枚	BR-1005-35

ストレプトアビジンタイプ（ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化）

Series S Sensor Chip SA Certified	3 枚	BR-1005-31

疎水基タイプ（リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化）

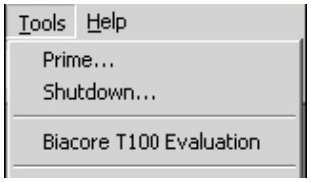
Series S Sensor Chip HPA	3 枚	BR-1005-33
Series S Sensor Chip L1 Certified	3 枚	BR-1005-38

金属キレートタイプ（His-tag タンパク質の固定化）

Series S Sensor Chip NTA	3 枚	BR-1005-32

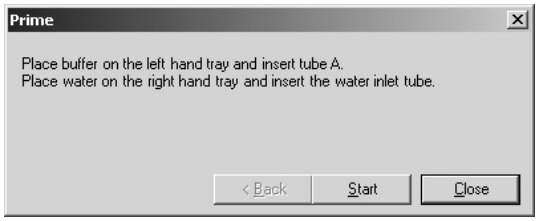
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

Menu bar の **Tools** → **Prime** を選択する。



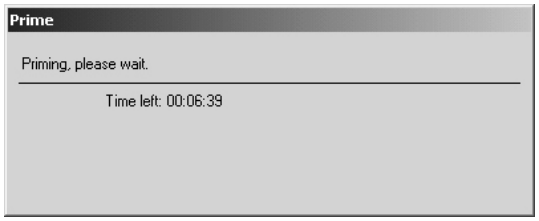
↓

ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start** をクリックする。



↓

Prime がスタートする。



↓

Close をクリックする。

自動的に **Standby flow** 状態になる。

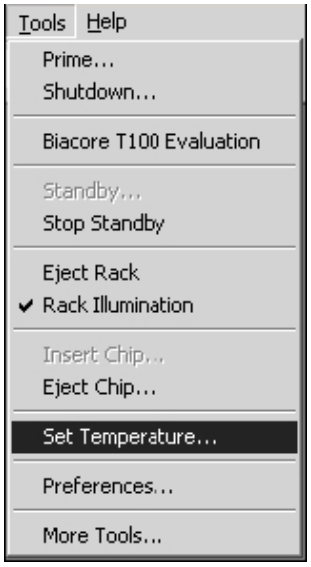
補足 1-8. 実験途中でのランニング緩衝液の交換

Primeは、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合にも必ず実行する。

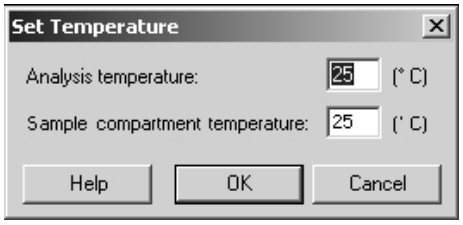
1-2-3. 温度設定

測定温度（Analysis temperature）およびサンプルコンパートメントの温度をそれぞれ設定する。

Menu bar の **Tools** → **Set Temperature...**を選択する。



↓



4 ℃～45 ℃の範囲で設定して、**OK** をクリックする。

（サンプルコンパートメントの温度は室温±15℃以内）

補足 1-9. 設定温度と実際の温度

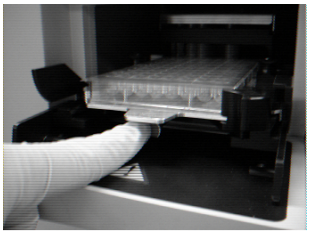
測定は設定温度で安定した後に実施する。

設定温度に達していない場合は画面上の Status bar 中の温度表示が赤の点滅、本体インジケーターの temperature ランプが橙色に点滅する。設定温度で安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わる。

温度が完全に安定するには、ある程度時間を要する。測定温度が室温（25 ℃）と大きく異なる場合は、あらかじめ設定しておく。

1-2-4. 試料のセットと取り出し

すべての試料は、ラックトレイにセットし、システム内に挿入する。サンプルコンパートメント内に入っているラックトレイを取り出すには、Toolbar の **Eject Rack** アイコン（ ）をクリックする。速やかにシステム本体前面のラックトレイポートが開きラックトレイが出てくる。

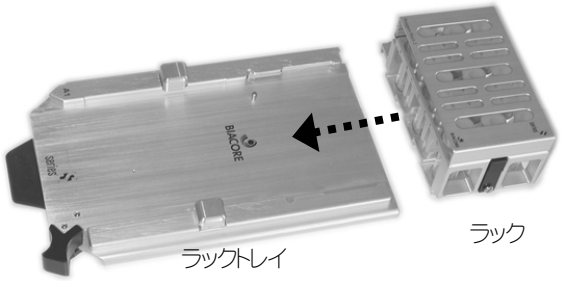


ラックトレイの下に配置した円形のボタンを押すとロックが外れ、ラックトレイを引出すことができる。

同時に画面上に **Eject Rack Tray** ダイアログが表示される。
ラックトレイポートは **60 秒**で自動的に閉まる。
すぐに閉めたい場合は **OK** をクリックする。

補足 1-10. ラックトレイとラックとバイアルの組み合わせ

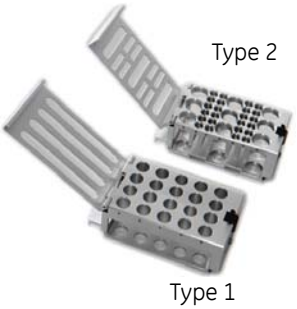
バイアルをセットするフォルダをラック、ラックをセットするトレイをラックトレイという。



各ラックは次のバイアルがセットできる。バイアルをセットする際は、必ず専用のラバーキャップを使用する。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使用しない。

Reagent rack, Type 1

1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 20 本



Reagent rack, Type 2

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本 または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 24 本

Sample and reagent rack（ラックトレイとラックの一体型タイプ）

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本 または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 24 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 45 本

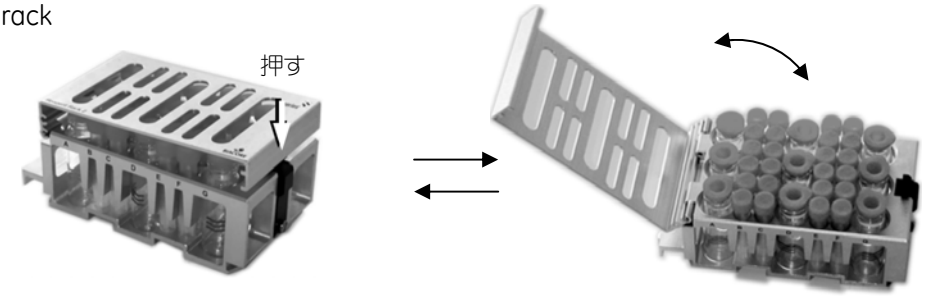
Rack tray

96 well/ 384 well マイクロプレート x 1 枚

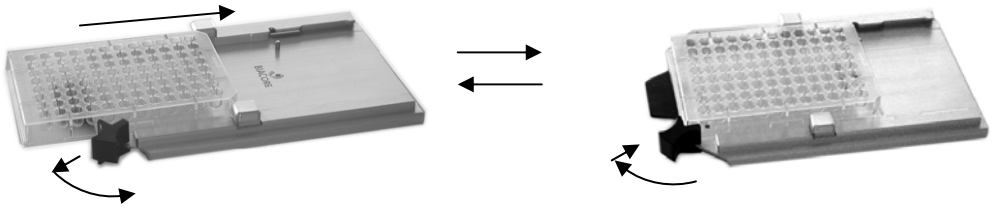
Rubber caps, type 3 BR-1005-02	Rubber caps, type 2 BR-1004-11		Rubber caps, type 5 BR-1006-55
7mm Plastic Vials BR-1002-12	1.5ml Plastic Vials BR-1002-87	16mm Glass Vials BR-1002-09	15mm Plastic Vials BR-1006-54

補足 1-11. ラックトレイへのバイアルおよびプレートのセット方法

Reagent rack

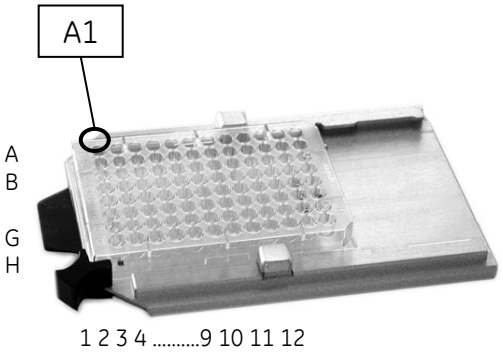


Rack tray



補足 1-12. バイアル位置の指定方法

バイアル位置は、ラックトレイ上の座標で指定する。ラックトレイ前面に刻印されている各列“A B C …”の手前から“1 2 3 …”とカウントする。(例. 左手一番手前は、“A1”。その奥は、“A2”。)



2. 基本操作

測定モードには、以下の3つのモードがある。測定モードを起動する際には、Toolbar の各アイコンをクリックする。

Manual run

画面上のアイコンを使い測定を行いながら操作するマニュアルモード。
簡単な試験など、数回の添加で完了する試験を行う場合に有効。

Application wizards

ガイダンスに従いながら、実験条件を入力して実行させるオートモード。
リガンド分子の固定化や濃度定量、相互作用解析、サーモダイナミクスなどの実験ごとの専用ウィザードや、pH スカウティングなど実験条件の検討を目的としたウィザードなど汎用性の高い実験項目について対応している。ほとんどの実験は、このモードを使用することで完了する。

Methods

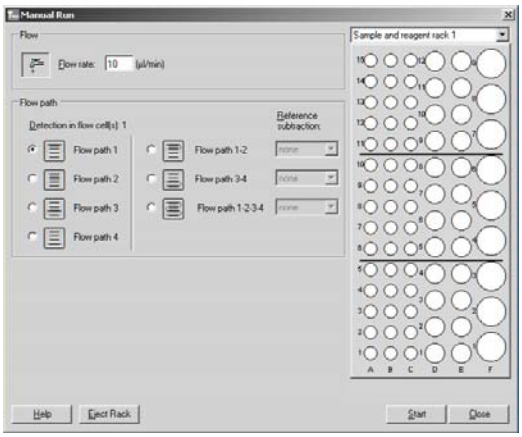
複雑な条件設定や特殊な設定が可能なオートモード。
メソッドビルダー機能によりメソッドを作成する。

ここでは、**Manual run** について説明する。

2-1. マニュアル測定の実行方法

Toolbar の **Start Manual run** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックする。

↓

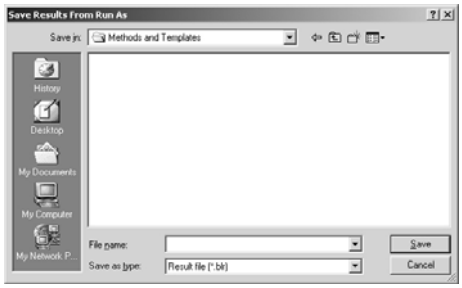


流速(**Flow rate**)を入力する。流速は、1～100ul/min で設定可能。
検出モード(**Flow path**)を選択する。プルダウンメニューでセットした **Rack** の設定を行う。ラックがセットされていない場合、**Start** をクリックしてもエラーメッセージが表示され先に進めない。測定開始後にサンプルをセットする場合でも、ラックを挿入する。
Start をクリックする。

補足 2-1. 試料必要量

試料必要量は、流速(ul/min)と添加時間(s)から計算される試料添加量(ul)に、流路の共洗い分 **28ul** を加算した量が必要である。平底のバイアルを使用する場合、特殊な添加モードを使用する場合は、必要試料量が異なる。測定開始後にサンプルをセットできるので、添加ダイアログに表示される必要試料量を確認後、試料調製を行いセットすると間違いがない。

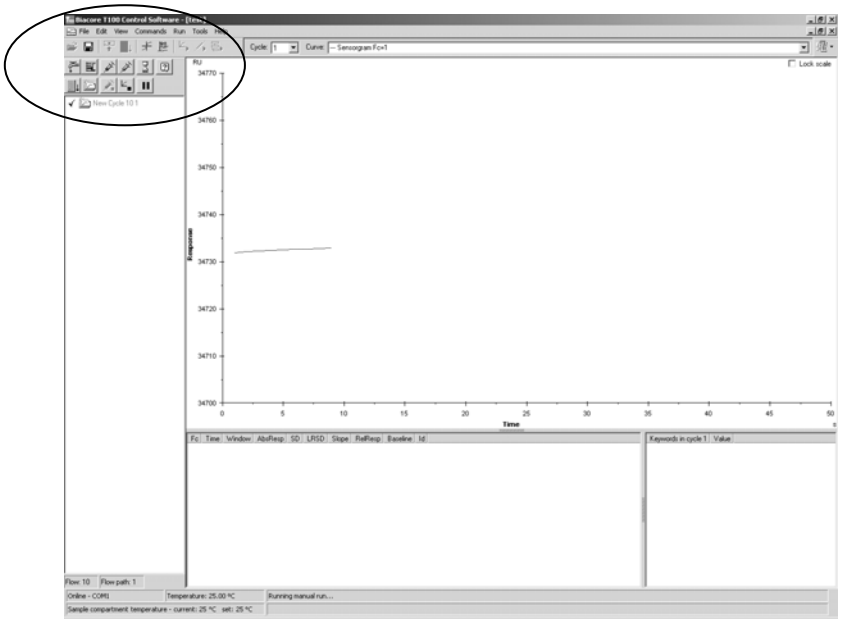
↓



ファイルの保存先を指定する。C:＼Bia Users＼(自分のフォルダ)に移動後、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され、測定が開始する。



補足 2-2. アイコンの説明

流速の変更

流路の切り替え

赤色　試料の添加、青色　洗浄溶液の添加

待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できる）

ラックの取り出し

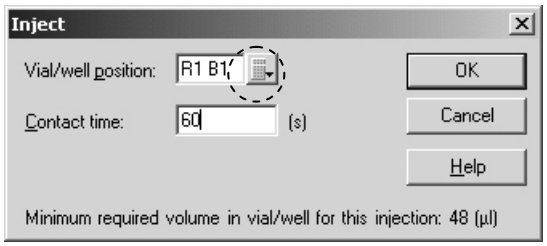
サイクルの切り替え

測定の終了

一時停止

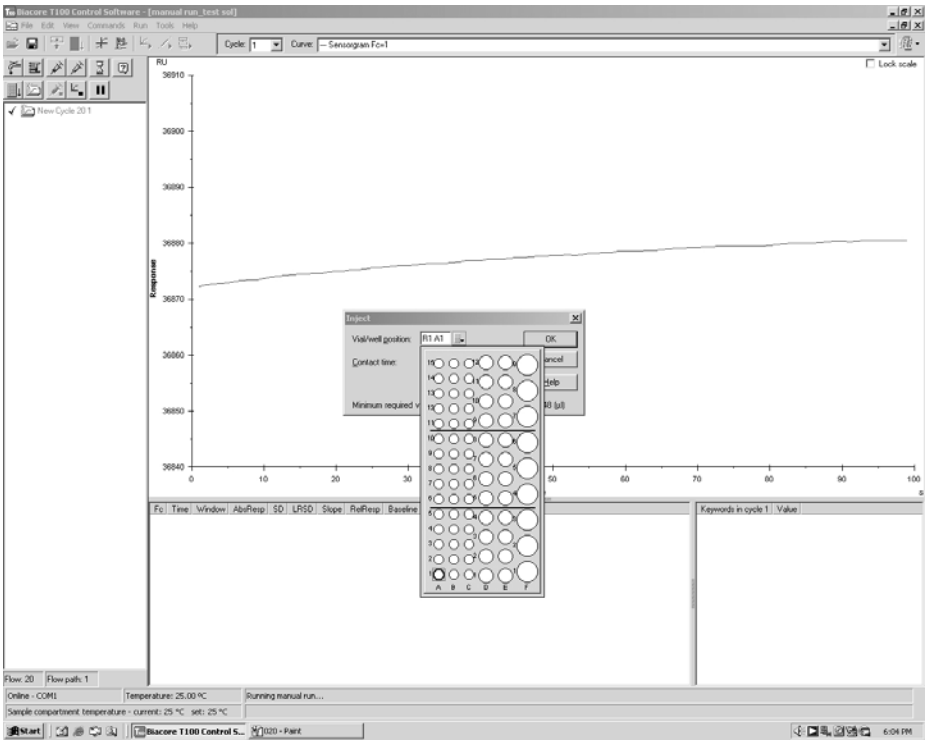
2-1-1. 試料の添加

Inject command アイコン（ ；赤色）または Menu bar の **Commands** → **Inject...**を選択する。



試料の位置（**Vial/well position**）および、添加時間（**Contact time**）を入力する。位置と添加時間を設定すると、**Inject** ダイアログの右下に必要量が表示される。

このとき、試料の位置入力ボックス右のアイコンをクリックするとラックの図上で選択できる。



試料をラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除する。

↓

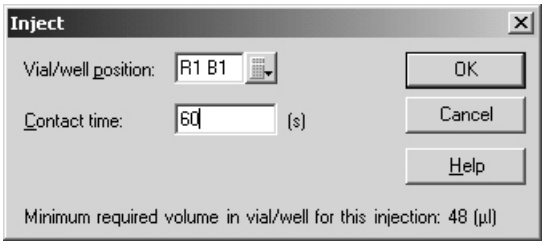
Eject rack tray アイコン（ ）または **Menu bar** の **Commands** → **Eject Rack** を選択する。

ラックトレイを取り出し、適切な量の試料を分注したバイアルをセットする。

↓

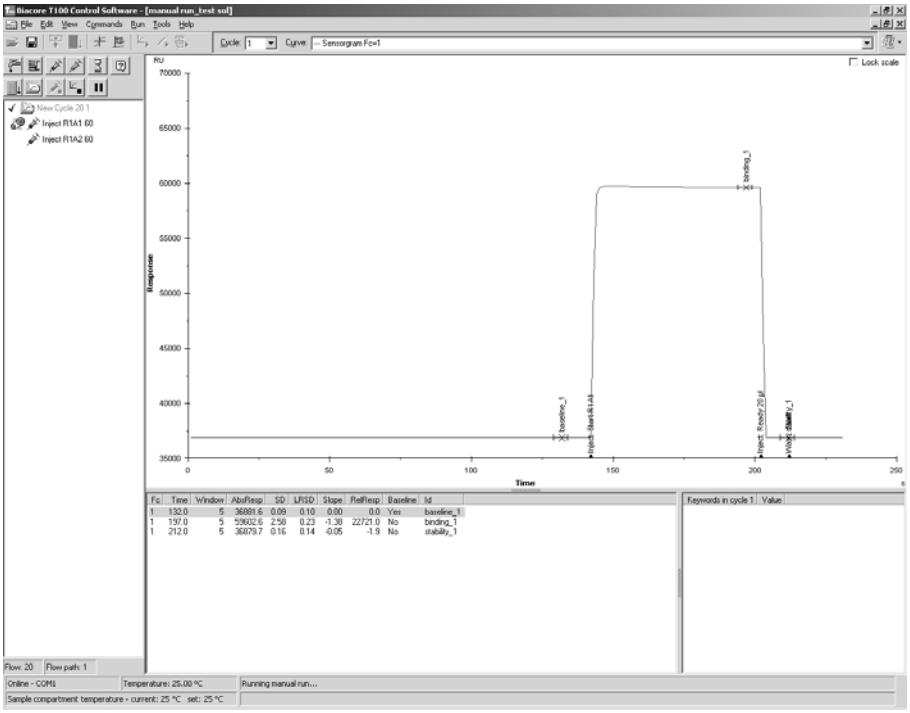
ラックトレイを再びシステム本体にセットし、**Inject command** アイコンを選択し、設定し直す。試料位置および添加時間を入力する。

↓



OK をクリックする。

↓

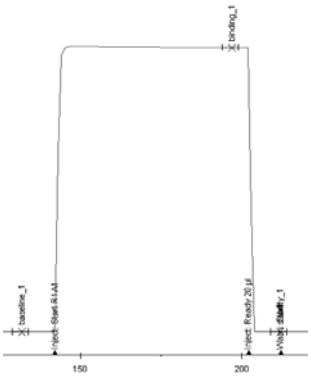


必要に応じ、引き続き試料を添加する。

2-1-2. レポートポイントの追加

レポートポイントとは、センサーグラムの任意の時間におけるレスポンス(RU)を、レポートポイントテーブルに表示させる機能をいう。試料添加を行った場合には、その都度自動的にレポートポイントが取得される。自動取得したレポートポイント以外にも、任意の時間で幾つも追加することができる。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント



レポートポイントテーブル

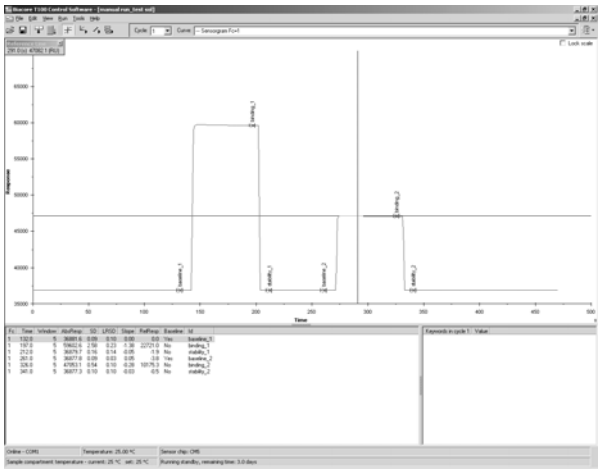
Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
1	132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
1	197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
1	212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1

Id(レポートポイント名)

baseline_1	添加開始 10 秒前
binding _1	添加終了 5 秒前
stability _1	添加終了 10 秒後

¨baseline_1˝ のセンサーグラムの高さ(RU)は “0(ゼロ)RU”(RelResp 0.0)に自動設定される。
“binding_1”もしくは“stability_1”の RelResp は、“baseline_1”からの相対値(RU)を示している。
2 つ目の試料添加時のレポートポイント名は、“baseline_2”“binding_2” “stability_2”となる。
RelResp は、“baseline_2”からの相対値(RU)となる。

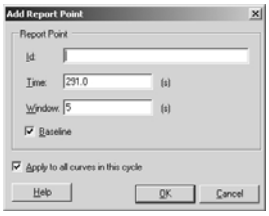
Toolbar の **Reference line** アイコン( )または Menu bar の **View** → **Reference Line** をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示する。



マウスのカーソル(矢印)をリファレンスラインの縦線に合わせ、任意の時間までドラッグするか、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレンスラインを移動する。

↓

Toolbar の **Add Report point** アイコン( )または Menu bar の **Edit** → **Report point** をクリックする。



Id にコメントを入力する。相対値 0(ベースライン)として設定する場合は **Baseline** をチェックする。**OK** をクリックすると、レポートポイントが追加される。

2-1-3. 測定の終了

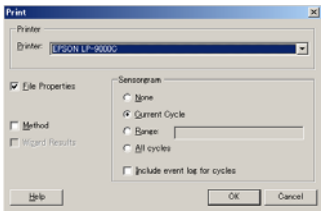
試料添加終了後、**End manual run** アイコン( )または **Menu bar** の **Commands** → **End Run** をクリックする。装置は自動的に **Standby flow** 状態になる。

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは測定終了時に自動保存される。
追加したレポートポイントを保存するには、Menu bar の **File** → **Save** をクリックする。

2-3. データの印刷

File → **Print...**をクリックする。印刷したい項目にチェックを入れ、**OK** をクリックする。



File Properties	ファイルプロパティ
Wizard Template または Method	測定内容(画面は Method になっているが、使用したプログラムによって表示が変わる。)
Wizard Results または Sensorgram	測定結果 Current Cycle は表示されているセンサーグラム、Range は複数サイクル存在する場合の必要な部分のセンサーグラム、All cycles はすべてのセンサーグラムの印刷を意味する
Include event log for cycles	イベントログ

3. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**リガンド**という。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく作用する。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載する。詳細およびその他の固定化方法については、“Biacore 実験の手引書”を参照。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジンε-アミノ基）を利用して固定化する方法。CM（カルボキメチル）デキストランのカルボキシル基をNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化する。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する。

固定化量

実験の目的によって調節する必要がある。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となる。固定化量の下限として、理論的最大結合量 Rmax（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも **20RU** は必要である。理論的な最大結合量は、以下の式で算出することができる。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 Rmax）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量 /リガンドの分子量 x S
（Da）　（RU）　（Da）
S はリガンドの結合部位数

（例）　リガンドの分子量　50,000 Da
リガンド固定化量　1,000 RU
リガンド結合部位数　1
アナライト分子量　20,000 Da
理論的最大結合量（Rmax）= 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くする。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000RU 以上固定化する。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなる。

反応速度定数（k_a,k_d）、解離定数（K_D）の算出

固定化量はできるだけ抑える。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためである。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となる。

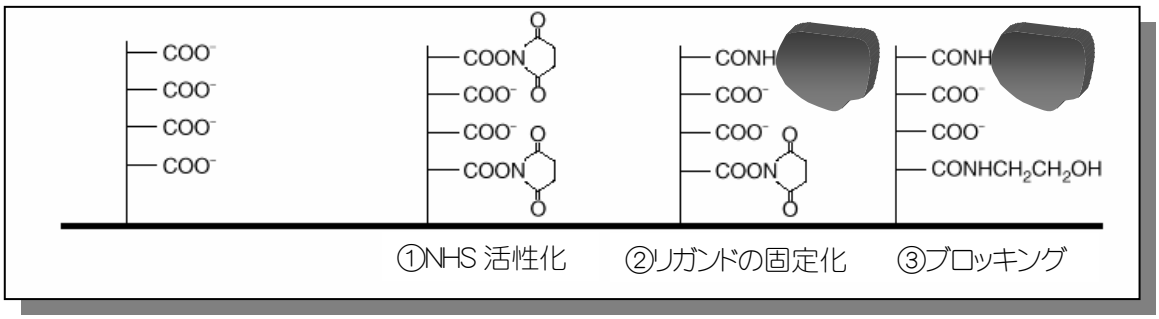
最小固定化量（RU）
40 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
最大固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドの結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50 kDa
アナライトの分子量	100 kDa
リガンド結合部位数	1
最小固定化量	40 x 1/1 x（50,000/100,000）＝ 20 RU
最大固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000）＝ 100 RU
至適固定化量範囲	20～100RU

3-1. アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジンε-アミノ基）を利用して固定化する。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解する。ただちに 200 ul ずつを 7 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで-20 ℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解させて使用する。融解後、試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4 ℃）保存する。200 ul ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注する。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液。（トリスやグリシン緩衝液は避ける。）

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの。リガンドの安定化目的のために混入されている BSA（ウシ血清アルブミン）等のタンパク質類はあらかじめ除去する。

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5～200 ug/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5～2 低い pH を使用する。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しない。

等電点が不明な場合は、固定化前に、あらかじめ、25 ページに示したウィザードの Immobilization pH Scouting により至適な 10 mM 酢酸緩衝液の pH を検討する。

濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、SA チップに固定化する方法を検討する。

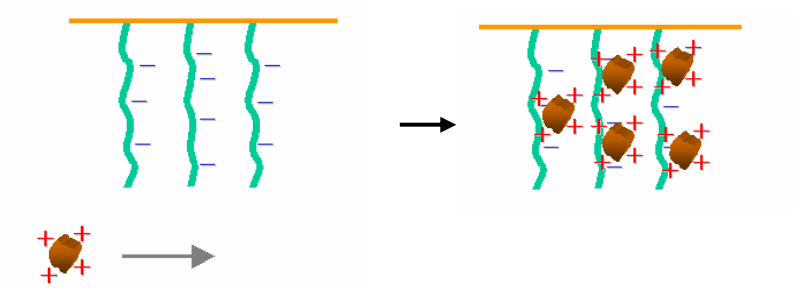
リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 ug/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）で希釈する。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後が最も高い。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施する。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認する。

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電している。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電しているCM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができる。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率良く固定化できる。



等電点が既知のリガンドの場合

等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの **Immobilization pH Scouting** により確認することをお奨めする。

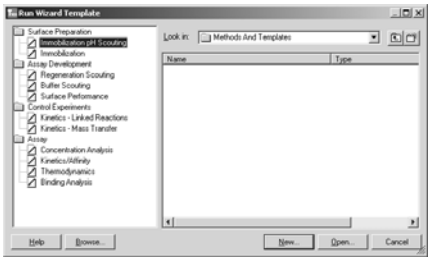
等電点が不明な場合

ウィザードの **Immobilization pH Scouting** を実行し、希釈液の pH を検討する。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価する。この検討で、リガンドは固定化されない。検討後、引き続き、そのセルに固定化を行う。

リガンドは終濃度 5～200 ug/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。

Immobilization pH Scouting では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離する。しかし、稀に、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドの洗浄を行う操作が組み込まれている。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

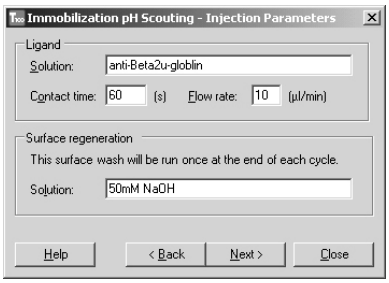


Surface Preparation → **Immobilization pH Scouting** を選択し、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓

条件検討を行う**Flow path**を選択する。固定化予定セルを選択し(偶数セルを選択する)、リガンド希釈液を入力する。(デフォルトの入力変更も可能。)**Next >** をクリックする。

↓



Ligand

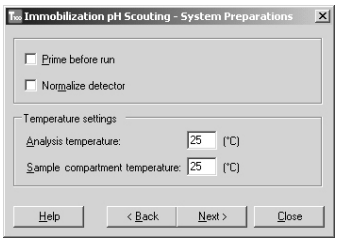
Solution	リガンドの名称	
Contact time	添加時間(s)	通常、60 s
Flow rate	流速(ul/min)	通常、10ul/min

Surface regeneration

Solution	リガンド添加終了後のチップ表面の洗浄溶液(50 mM NaOH)	

各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックする。

↓



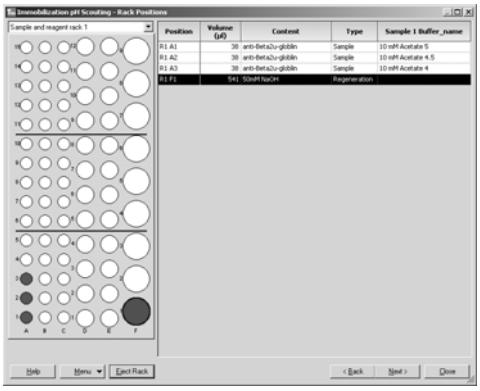
固定化操作を始める前に、**Prime** および **Normalize** を行う設定ができる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

入力後、**Next>**をクリックする。

↓



右側の表で試薬の位置と必要量（ul）を確認する。表をクリックすると対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になる。位置と必要量（ul）を確認しながら、調製したリガンド、試薬バイアルをラックにセットする。

↓

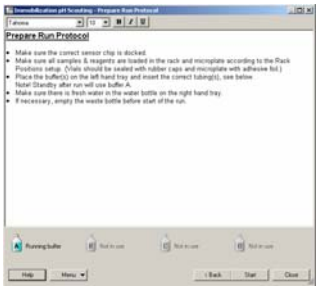
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

↓

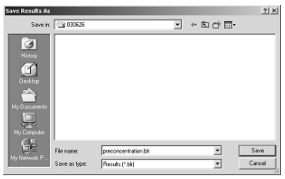


基本的な共通注意事項が表示される。
Start をクリックする。

↓

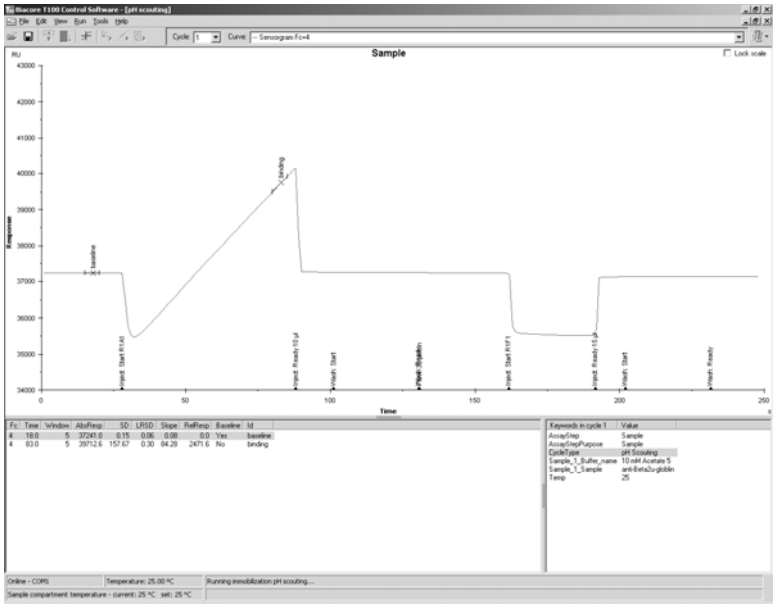
設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



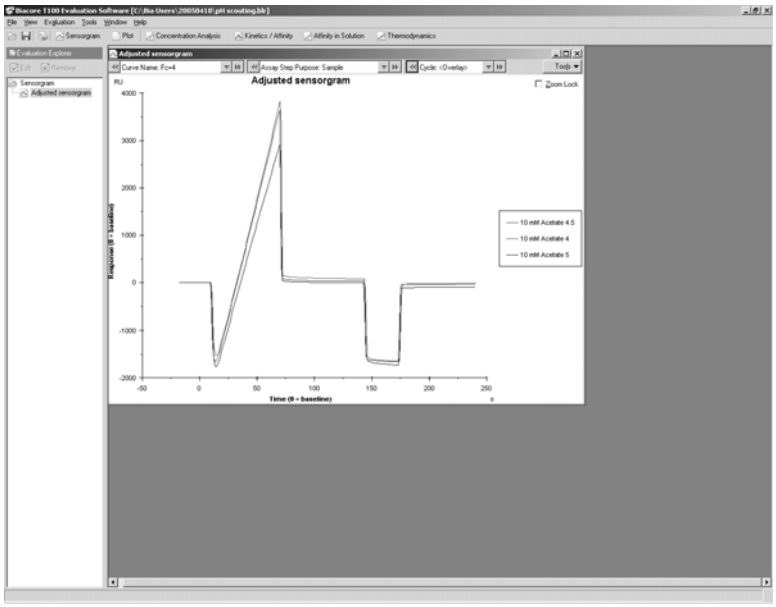
Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓



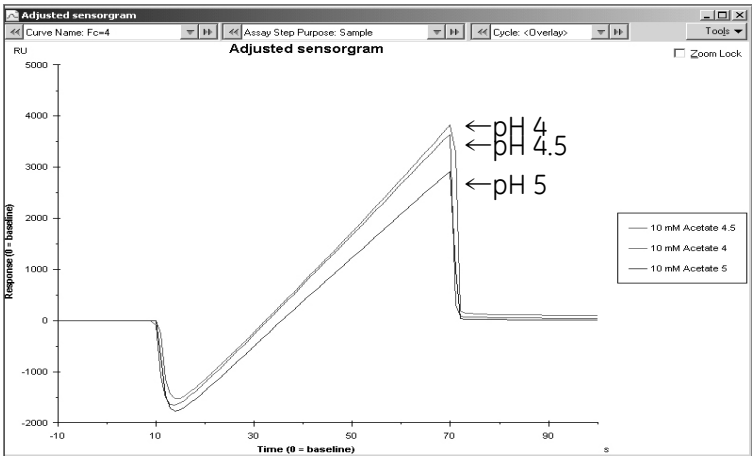
Immobilization pH Scouting 終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各 pH の測定結果が重ね書き表示される。(Control Software 上の測定データは入力したファイル名で自動保存されている。)

↓



センサーグラムより、濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

補足 3-1. Immobilization pH Scouting の評価



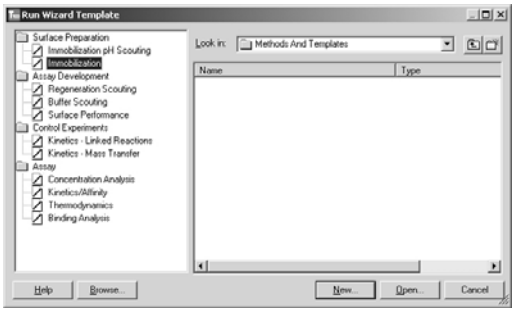
濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

上記結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は減少する（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5）。また、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。上記結果では、pH5 を選択する。

なお、Immobilization pH Scouting における濃縮度合い以上量の固定化は困難である。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、濃度をあげて（例 100ug/ml 等）、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認する。

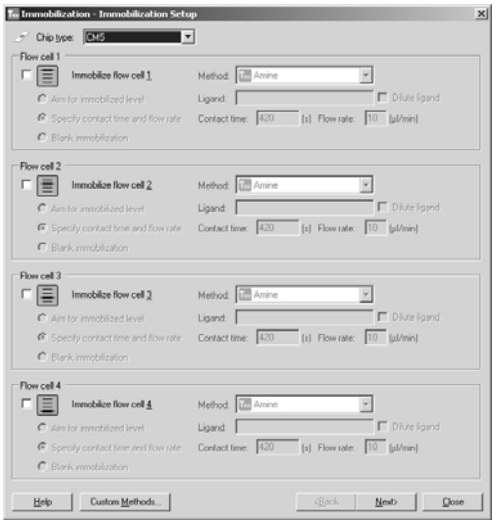
3-1-2. 基本プロトコールでの固定化

Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

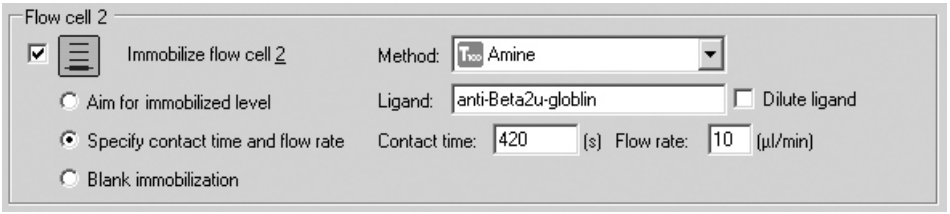


Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



Chip type:のプルダウンメニューで、使用するセンサーチップ(**CM5**)を選択する。



固定化する **Flow cell** にチェックを入れる。固定化は偶数セルを選択するのが望ましい。

Method　固定化方法　プルダウンメニューで、**Amine** を選択

Ligand　リガンドの名称

標準プロトコールでは、NHS 活性化とブロッキングは流速 10 ul/min、添加 7 分間と固定化されている。リガンドの添加条件については、以下の項目から選択する。

Aim for immobilized level

リガンドの固定化量を調節して固定化。

Specify contact time and flow rate

リガンドの添加時間と流速を指定し固定化。

Blank immobilization

リガンドの添加なし。NHS 活性化後エタノールアミンでブロッキングしたリファレンスセルを作成。

ここでは、Specify contact time and flow rate を選択し、標準的な条件、添加時間 420(s)、流速 10（ul/min）を入力する。

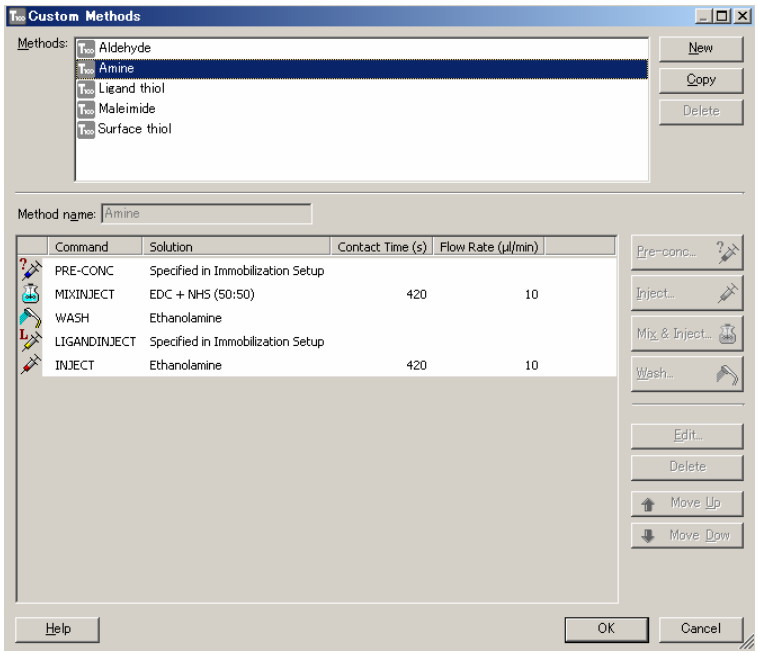
Next >をクリックする。

↓

補足 3-2. 標準プロトコールの変更

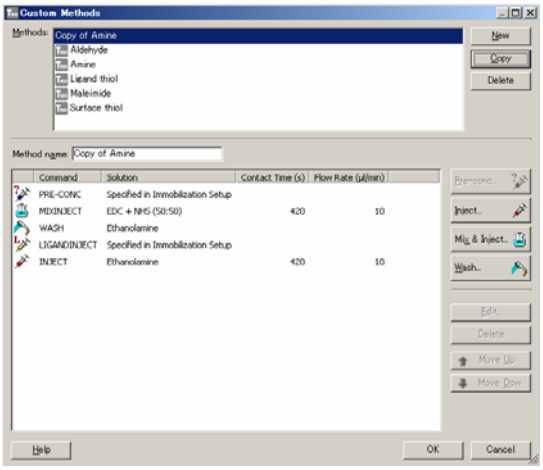
Specify contact time and flow rate は、活性化時間およびブロッキング時間は 7 分間と指定されている。固定化量を多くする目的で、添加時間を長くしたいなど、既存のメソッドを変更する場合は、画面左下の **Custom Methods...**をクリックする。

画面上部に既存のメソッドが表示されている。**Amine** をクリックし、ハイライトにする。

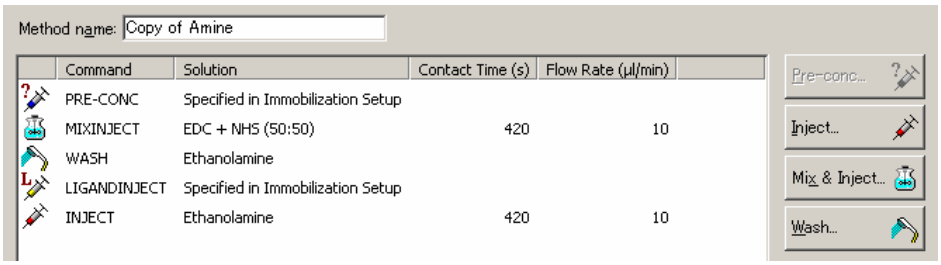


画面右上の **Copy** をクリックする。

↓



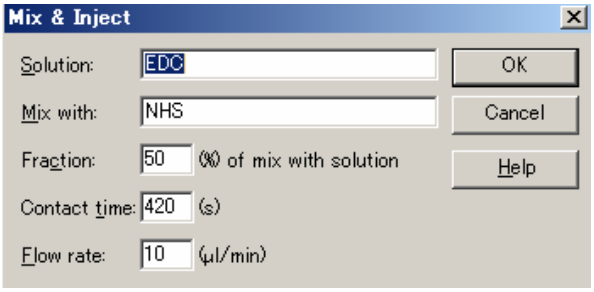
Methods:に、コピーしたメソッドが追加される。



コピーしたメソッドを元に、各項目の条件を変更することができる。変更したいコマンドをダブルクリックするか、またはクリックして **Edit...**をクリックする。

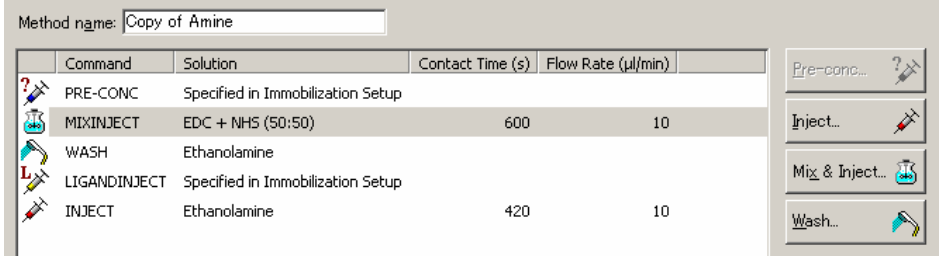
↓

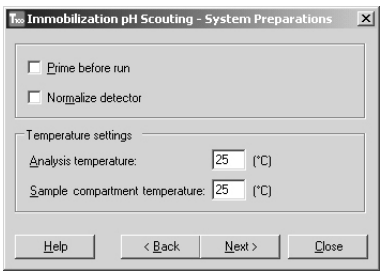
(例) EDC/NHS の項目



必要に応じて流速および添加時間を変更後、**OK** をクリックする。

↓





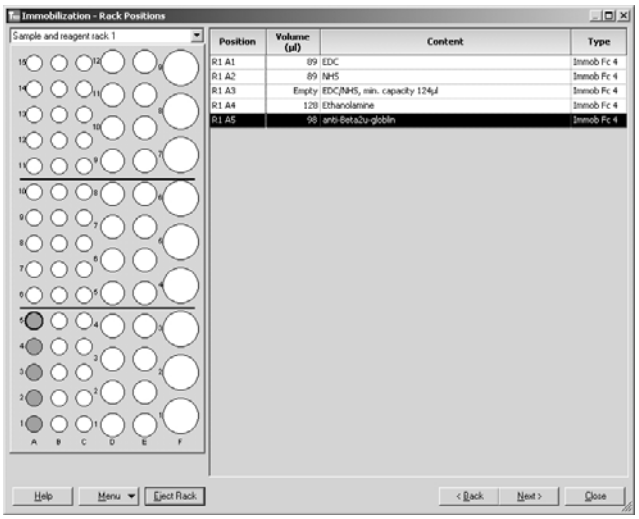
固定化操作を始める前に、自動で **Prime** および **Normalize** を行う設定ができる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Next >をクリックする。

↓



右側の表で試薬の位置と必要量（ul）を確認する。表をクリックすると対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になる。位置と必要量を確認しながらバイアルをラックにセットする。

EDC	89 ul/ 7 mm プラスチックバイアル
NHS	89 ul/ 7 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 7 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	128 ul/ 7 mm プラスチックバイアル
Ligand	98 ul/ 7 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる

↓

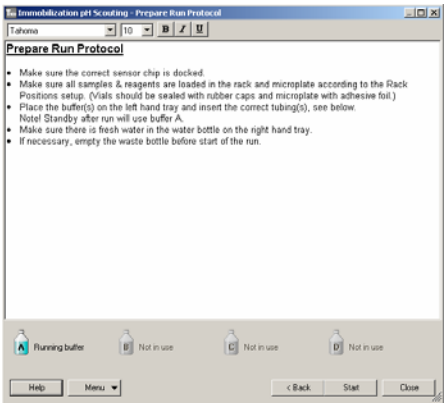
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入して **OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


Immobilization pH Scouting - Prepare Run Protocol
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Running buffer
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な共通注意事項が表示される。

Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓

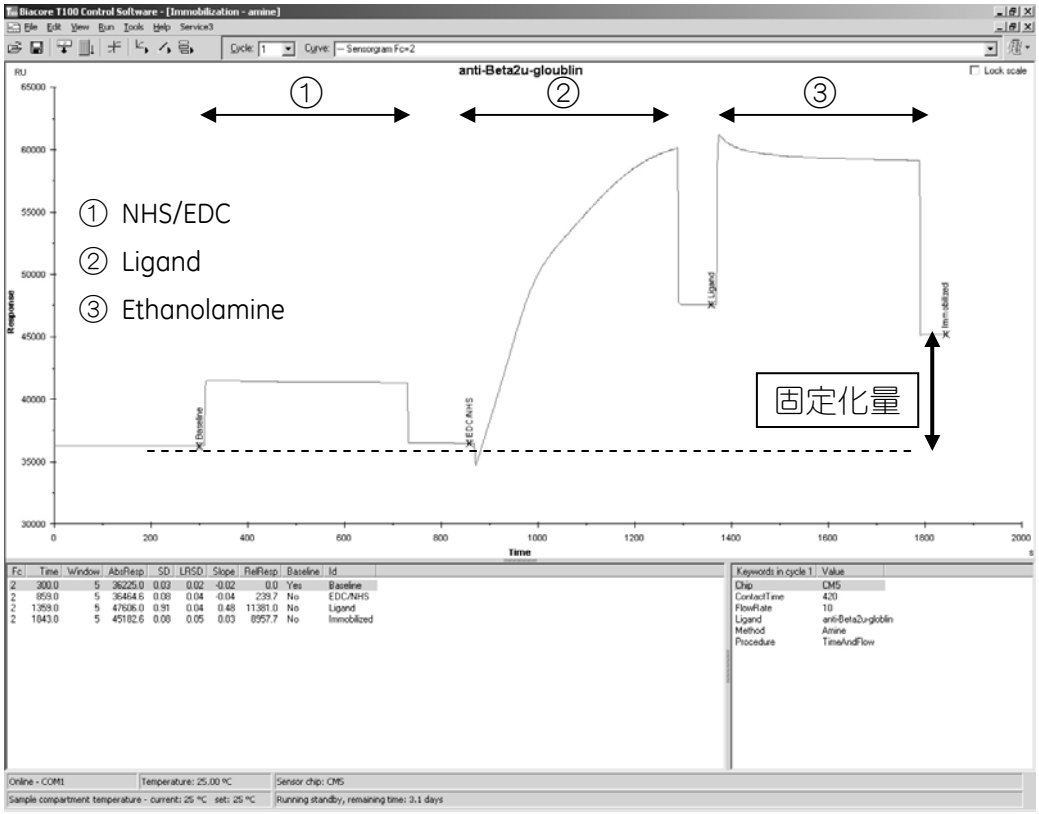
Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

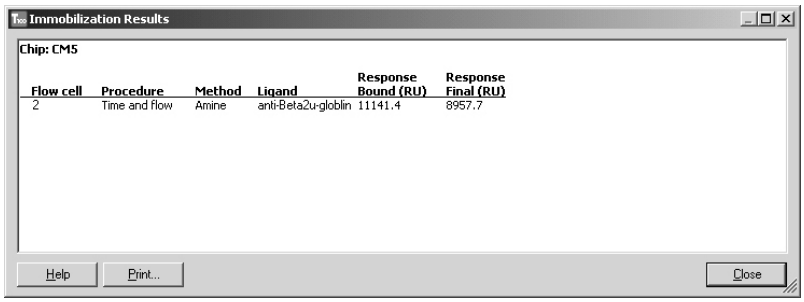
固定化終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。測定データは入力したファイル名で自動に保存される。

補足 3-3. 緊急停止

測定開始後、プログラムを緊急停止したい場合には、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。



固定化量（Response Final）（RU）が別途表示される。



補足 3-4. 固定化量の確認

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示される。

Bound　　リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差

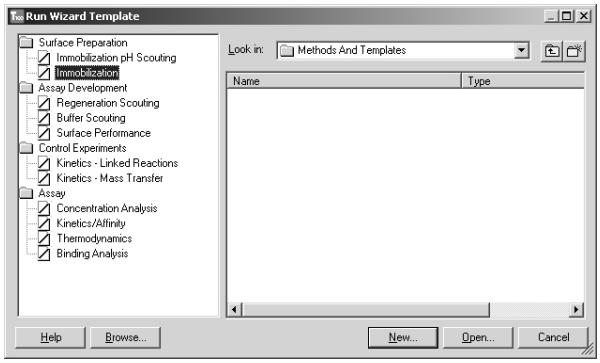
Final　　NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差

リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなる。また、きわめて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

3-1-3. 固定化量を調節して固定化

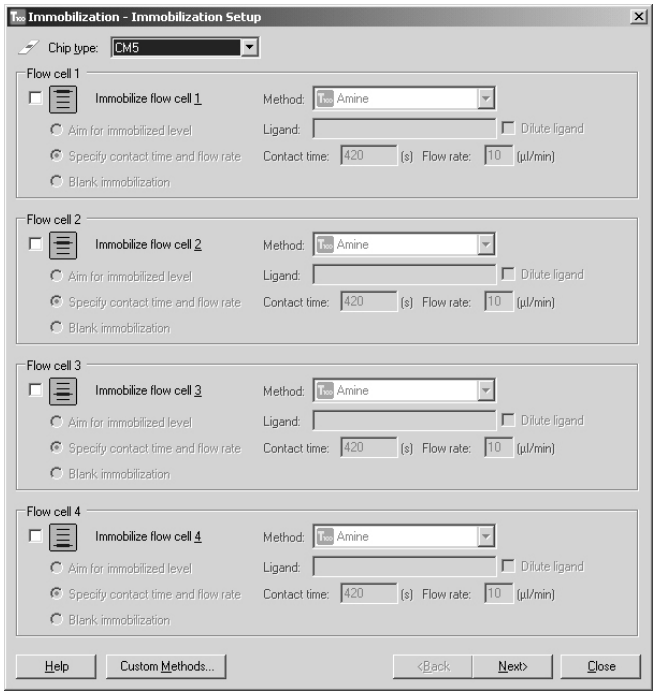
反応速度定数算出を目的とした実験の場合、厳密に固定化量を調節する必要がある。その場合、リガンドの添加方法として、**Aim for Immobilized level** を利用する。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

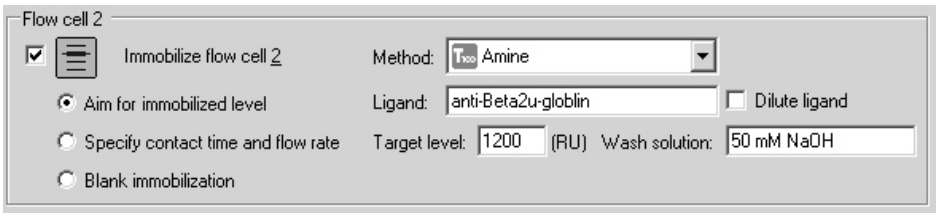


Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



↓



固定する **Flow cell** を選択する。**Aim for immobilized level** にチェックを入れる。

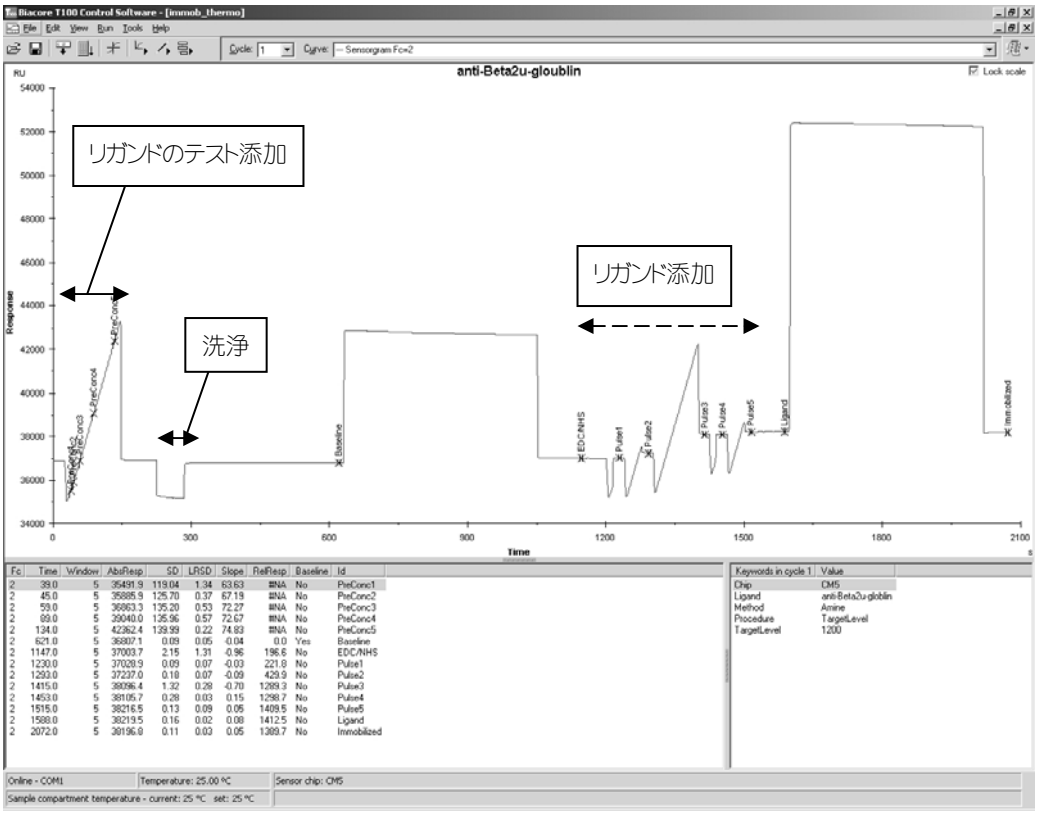
Method	固定化方法	プルダウンメニューで、**Amine** を選択
Ligand	リガンドの名称	
Target level	目標固定化量（RU）	
Wash solution	固定化前のリガンドテスト添加後のチップ表面洗浄液（50 mM NaOH）	

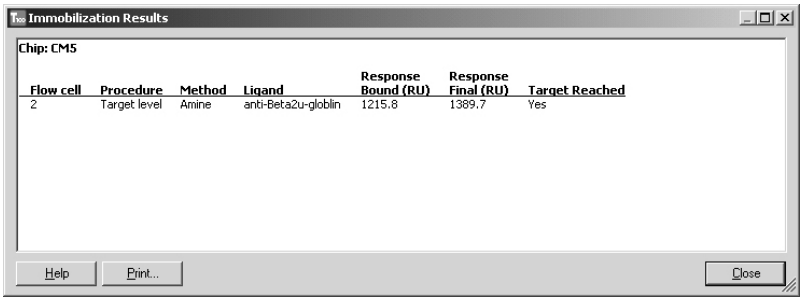
各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックする。

↓

以下測定方法は、30 ページから 35 ページを参照。

↓



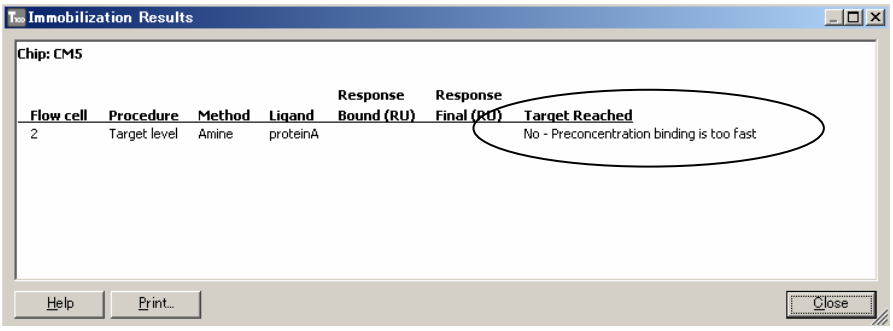


Immobilization Results ダイアログに固定化量（RU）が表示される。目標固定化量に到達したかは、**Target Reached** に表示される。最終的な固定化量は、前章同様、小さい方の Response を採用する。

補足 3-5. 固定化ウィザードの中断

このウィザードでは NHS 活性化を実行する前に、リガンド溶液をテスト添加し、濃縮効果が得られるか、また、その結果から目的の固定化量が調節できる条件であるかを判断する。

リガンド条件に問題がある場合、この時点でプログラムが自動的に終了する。リガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製し直して、同じフローセルに再度固定化を試みる。



Preconcentration binding is too fast

濃縮効果が強すぎ、添加時間を短くしても目標のレベル以上固定化されると判断。

希釈緩衝液の pH をあげるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮効果を下げて再度固定化し直す。

Preconcentration binding is too slow

濃縮効果が不十分または観察されず、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できないと判断。

希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度をあげることにより、濃縮効果をあげて再度固定化し直す。

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討

マニュアル操作により、アナライトの特異的結合の確認を行う。引き続き、再生条件の検討を行う。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確認を行う。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子。血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用できるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、精製したモル濃度が既知のアナライトが必要となる。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ過等を使用しバッファー交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件に合わせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：バックを流れている緩衝液の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生する。溶液効果はスクリーニングのように結合の有無を評価することを目的とした実験においては問題とならないが、反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域と解離領域が異なる緩衝液組成条件下になり解析結果に影響を与える。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、数十 ng/ml～数百 ug/ml で行う。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られる。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、濃い目の濃度（タンパク質アナライトの場合、数～数十 ug/ml）を用いるのが望ましい。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加する。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用する。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生という。解離が速い相互作用では、ランニング緩衝液が流れることで短時間でアナライトが完全に解離するため、再生の必要がない。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液をアナライト結合表面に 30 秒～1 分間添加し再生を行う。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに

異なるため、その都度検討が必要となる。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない

アナライトを完全に解離する

リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない

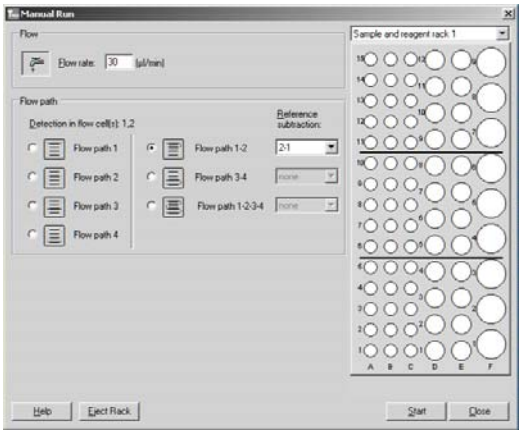
補足 4-1. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。検討の際にはマイルドな条件から検討を行う（塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液）。

試薬	濃度あるいは pH
塩	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

Toolbar の **Start Manual run** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックする。

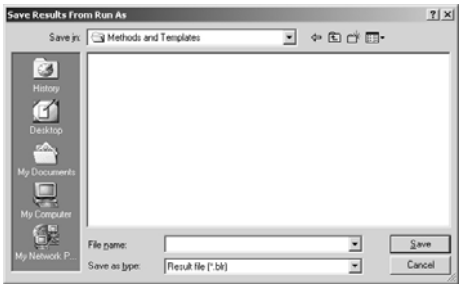
↓



流速(**Flow rate**)(30 ul/min)を入力する。**Flow path** でアナライトを添加するリファレンスセルと固定化セルの選択を行う。必ず、**Reference subtraction** でリファレンスセルの差し引き設定を行う。(選択肢として 2-1, 4-3 または、2-1, 3-1, 4-1 がある。)

Rack の選択を行い **Start** クリックする。

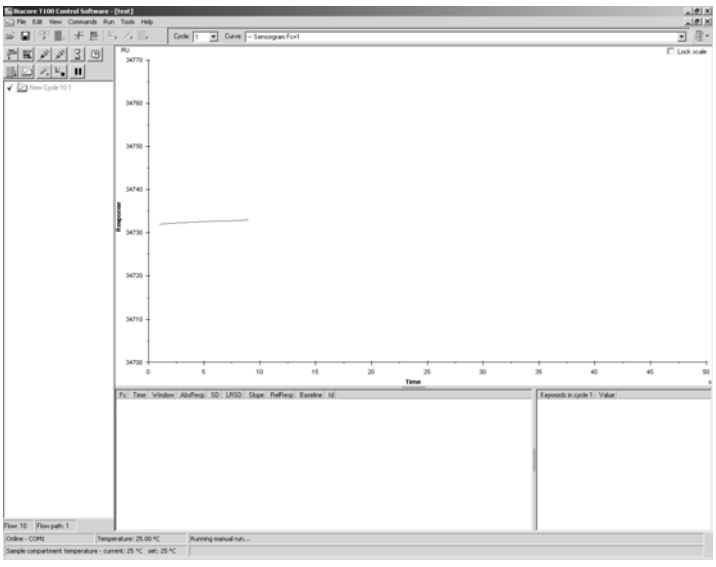
↓



測定結果の保存先へ **File name** を入力して **Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され測定が開始する。



補足 4-2. センサーグラムの表示変更

View → Show Only Current Curve

選択したセンサーグラムを 1 本表示。

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択する。

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムを表示。

View → Show Curves of Same Type

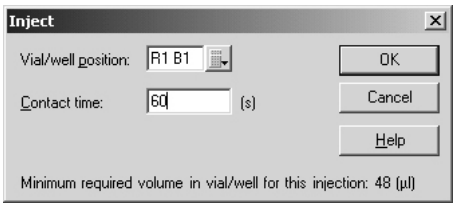
カーブの種類別表示。

右上のカーブリストから、各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムのいずれかを選択して表示することができる。

↓

Inject command アイコン（ ；赤色）または **Menu bar** の **Commands → Inject...**を選択する。

↓



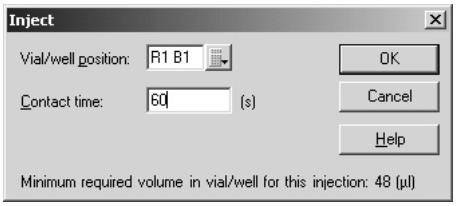
アナライトの位置（**Vial/well position**）および、添加時間（**Contact time**）60～120 秒を入力すると、**Inject** ダイアログの右下に必要なサンプル量が表示される。

↓

一旦、**Cancel** をクリックし、**Eject rack tray** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands → Eject Rack** を選択する。

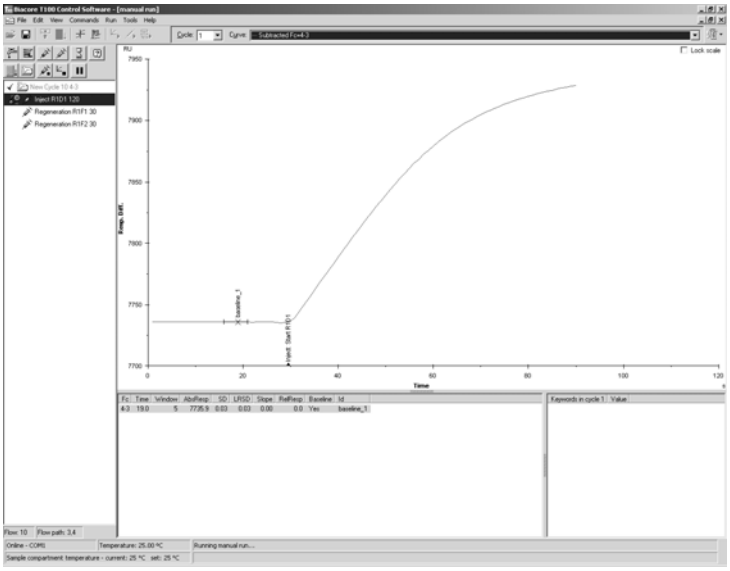
ラックトレイを取り出して、アナライトを分注したバイアルをセットする。ラックトレイを再び本体に戻して、**Inject command** アイコンを選択する。

↓



アナライトの位置および添加時間（s）を入力する。**OK** をクリックする。

↓

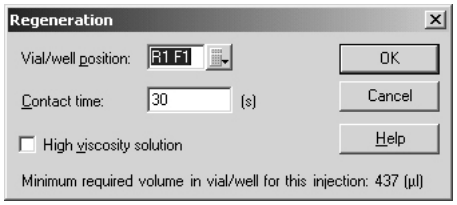


↓

アナライトの結合が確認でき、再生の必要がある場合には引き続き検討を行う。

Regeneration command アイコン（ ；緑色）または **Menu bar** の **Commands** → **Regeneration...**を選択する。

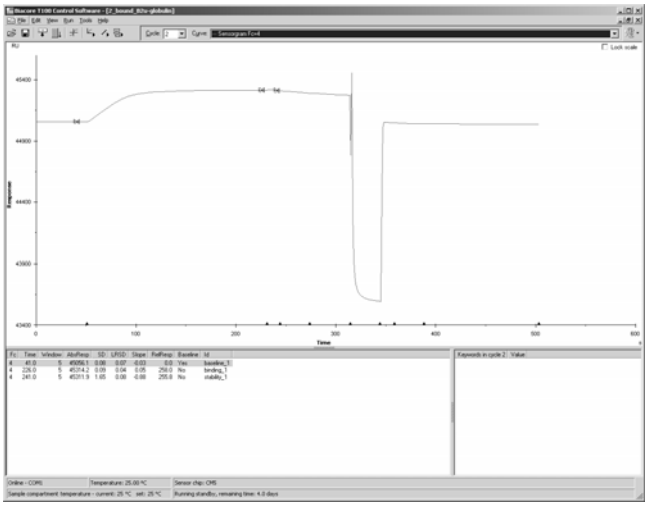
↓



再生溶液の位置および添加時間（30 s～60s）を入力して、**OK** をクリックする。

（再生溶液をセットしていない場合には、必要容量確認後、一旦、**Cancel** をクリックしてバイアルをセットする。）

↓



↓

レポートポイントまたはリファレンスラインウィンドウを利用して、再生の確認を行う。
再生が不十分な場合には、引き続き検討を行う。

↓

再生条件検討後、固定化リガンドの活性および再現性を確認する。
New Cycle アイコン（ ；アイコンが並んでいる下段左から 2 番目）をクリックし、測定サイクルを切り替える。同濃度のアナライトを添加し、前回のアナライト結合レスポンスと比較する。引き続き、再生を行う。

↓

すべての検討が終了したら、**End manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands** → **End Run** をクリックする。装置は自動的に **Standby flow** 状態になる。
測定データは初めに入力したファイル名で自動に保存される。

補足 4-3. リファレンスウィンドウを利用した再生の確認方法

Tool bar の **Reference Line** アイコン（ ）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。同時にセンサーグラム左上にリファレンスラインウィンドウ（

）が表示される。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラックし、ベースラインをとりたい時間に移動する。もしくはベースラインをとりたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動する。

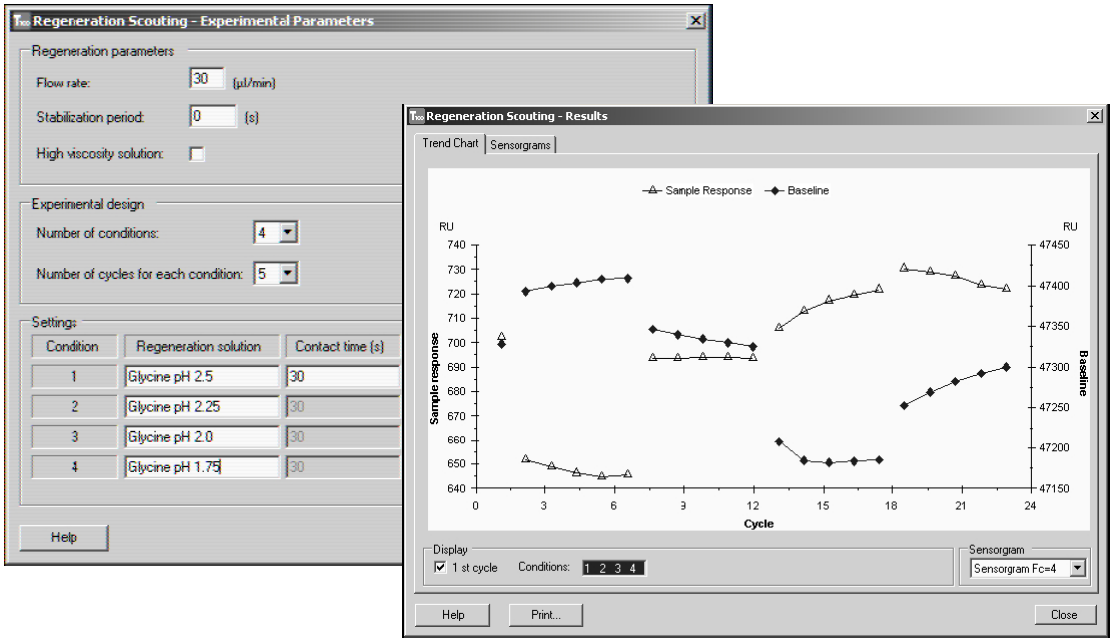
↓

View → **Biase Line** をクリックすると、リファレンスラインウィンドウのレスポンスが相対値 0 となる。リファレンスラインの縦軸にもう一度カーソルを合わせ、左ボタンでドラッグし移動させると、リファレンスウィンドウにベースラインとして設定した位置からのレスポンスが表示される。

補足 4-4. ウィザードを用いた再生条件の検討

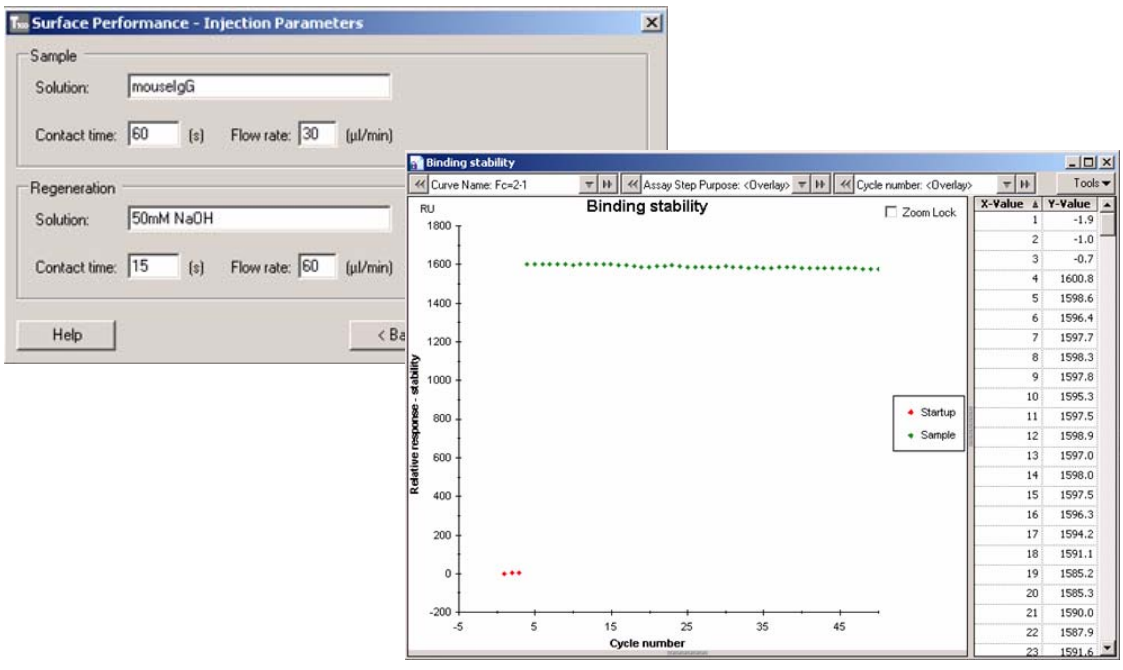
Application Wizard/ Assay Development/ **Regeneration Scouting**

複数の再生溶液を用いて、各再生溶液で設定した添加条件で、最大 5 回まで、アナライト結合量の変化とベースラインの安定性を評価できる。



Application Wizard/ Assay Development/ **Surface Performance**

決定した再生条件でセンサーチップの安定性を評価する。400 回までの繰り返し測定が可能。



5. 相互作用測定

実験目的に応じたウィザードまたはメソッドのテンプレートに、サンプル名や添加情報および再生条件等、必要事項を入力するだけで、プログラムを組み立てることができる。
この章では、上記テンプレートを利用した基本的なプログラム作成について記載する。メソッド作成方法の詳細は、6 章を参照。

ウィザードテンプレートを利用

反応速度定数および解離定数の算出	Kinetics/Affinity	47 ページ
濃度測定	Concentration Analysis	69 ページ
結合の有無の確認、スクリーニング	Binding Analysis	85 ページ
熱力学的パラメータの算出	Thermodynamics	99 ページ

メソッドテンプレートを利用

低分子化合物アナライトの相互作用測定	LMW screen, LMW kinetics	115 ページ
結合アナライトの回収	Inject and recover	137 ページ

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出

アフィニティーとカイネティクス

分子同士が相互作用するときには、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現する。解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述される。その逆数 1/ K_D（= K_A、単位 1/M）が用いられることもある。解離定数は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = [A] [B]/[AB]と定義される。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強い。ビアコアを用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の結合と解離の速さから算出する（ $K_D = k_d / k_a$ ）。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは強い。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメータは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現される。

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

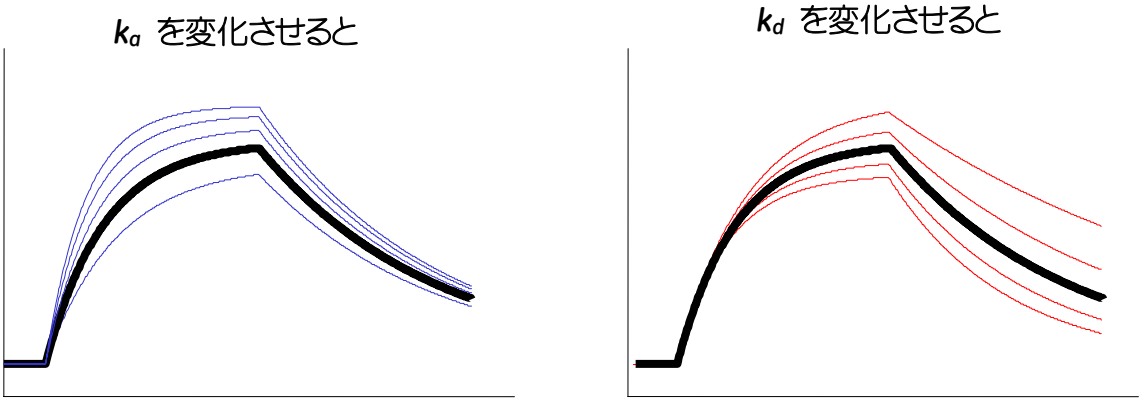
$$K_D = k_d / k_a$$

$$K_A = k_a / k_d$$

解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a、k_d）の算出方法

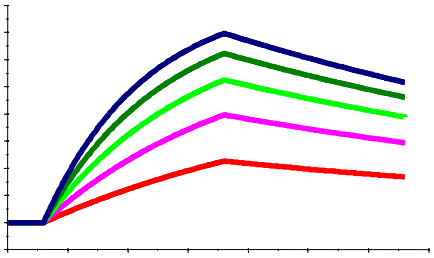
カイネティクス解析では、得られたセンサーグラムに直接反応速度式をカーブフィッティングさせ、非線形最小二乗法により定数を導き出す。

$$R = f(k_a, k_d, Rmax, C, ...)$$

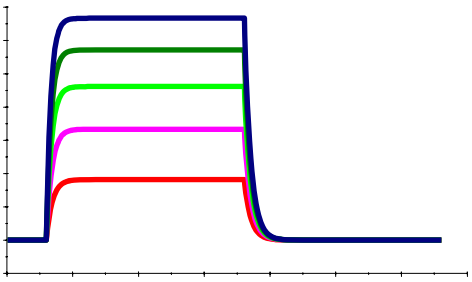


アフィニティーの弱い相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態(Req)へと移行するが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは箱型となる。結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難である。

アフィニティーが強い反応



アフィニティーが弱い反応

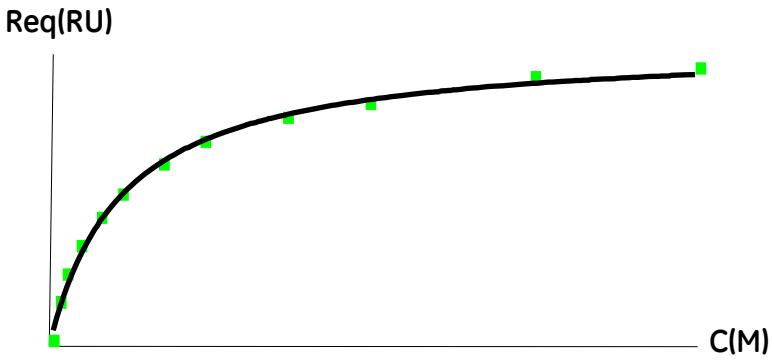


カーブフィッティングによる解析

Req vs C のプロットからの平衡値解析

このような場合、アナライト濃度(C)に対する平衡値(Req)のプロットから、親和定数(K_A)あるいは解離定数(K_D)を算出する。平衡状態では、以下の関係式が成り立つ。

$$Req = C \times Rmax / (C + K_D)$$



<u>至適アナライト濃度</u>

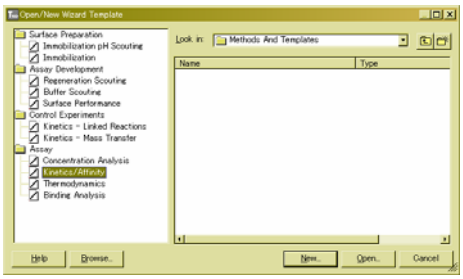
良好な結果を得るためには、予想される解離定数(K_D)値の 1/10～10 倍の濃度で測定する。また、5 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定し、1 濃度については、2 回(n=2)測定する。

アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。濃度範囲は、高濃度側まで幅広くとることを推奨する。

5-1-1. プログラムの実行

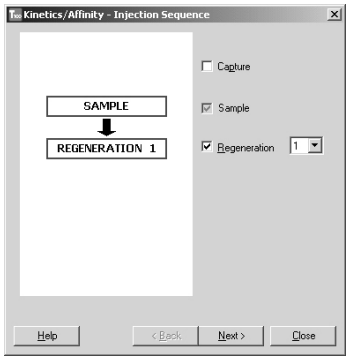
Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

↓



Assay → **Kinetics/Affinity** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

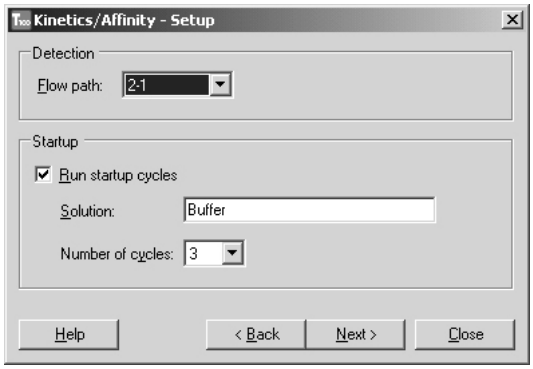
Sample

アナライトの添加

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回もしくは 2 回の選択をする。**Next >** をクリックする。

↓



Detection

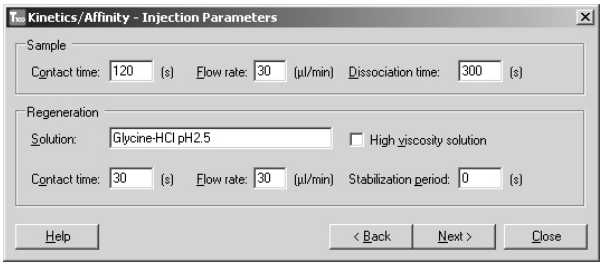
Flow path　相互作用測定を行うフローセルを設定する。
2-1 または 4-3 から選択。

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をサンプル（アナライト）測定前にダミーランとして実施する。ランニング緩衝液を用い、3 回以上実施することを推奨する。

Next >をクリックする。

↓



Sample

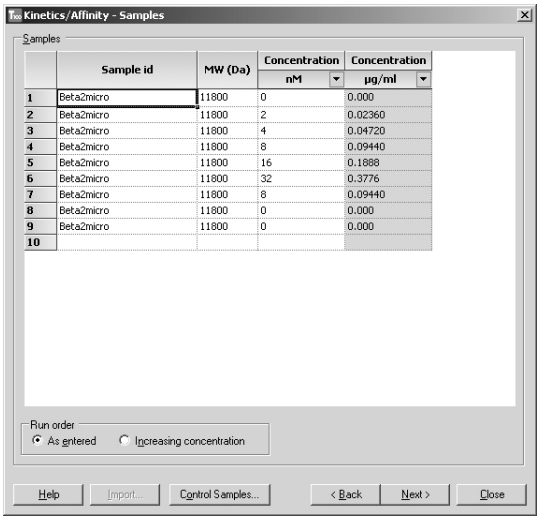
Contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Regeneration

Solution	再生溶液の名称	
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%　エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れる。	
Contact time	再生溶液の添加時間	30 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Stabilization period	再生溶液添加後のベースライン安定化時間	0 s

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Sample id　　アナライトの名称

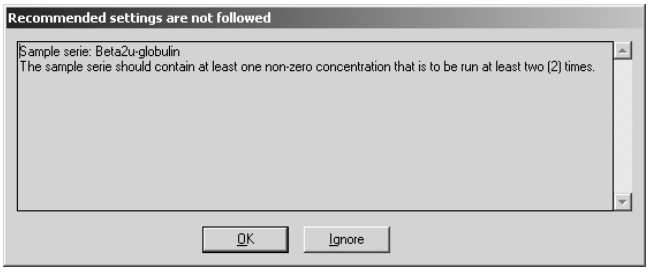
MW (Da)　　アナライトの分子量

Concentration　　アナライトの濃度（単位も選択）
分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 ug/ml”を換算する。

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-1. アナライト濃度

測定サンプル濃度は、アナライト 5 段階以上の濃度シリーズ と“0（ゼロ）濃度の測定を推奨している。また、測定中のリガンドの安定性確認のために“0（ゼロ）”以外で最低 1 濃度を 2 回測定することも推奨している。このルールに従わない場合、**Samples**ダイアログ入力後に**Next >**をクリック時、警告が表示される。

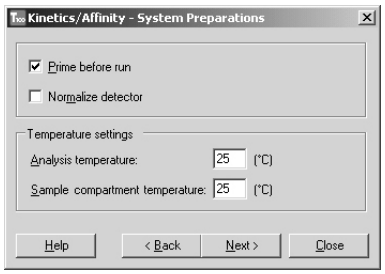


警告を無視して測定を強行したい場合は、**Ignore** をクリックし、次のステップに進む。

補足 5-2.Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓



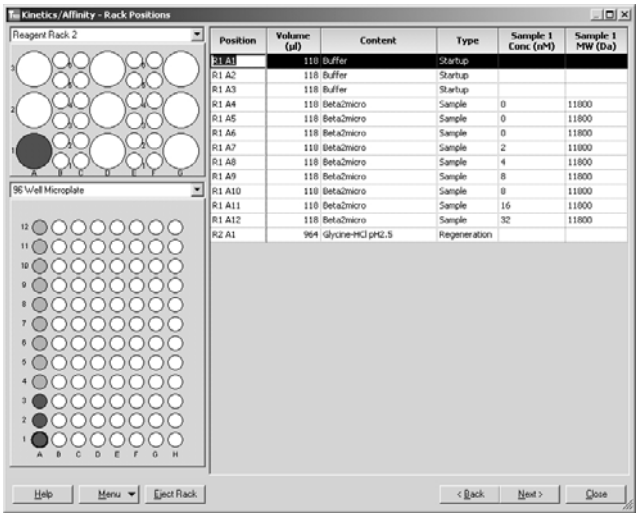
測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** を行う設定ができる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



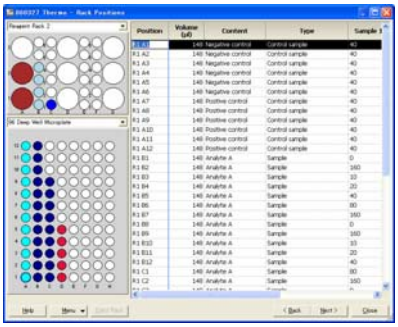
右側の表でサンプルの位置と容量(ul)を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-3. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

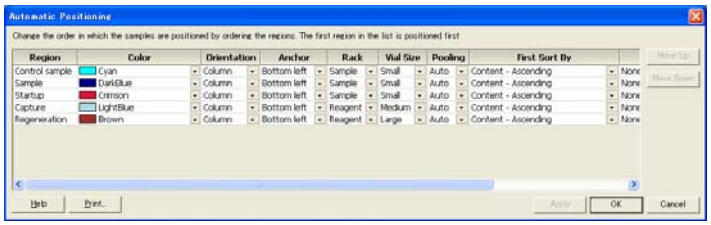
補足 5-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

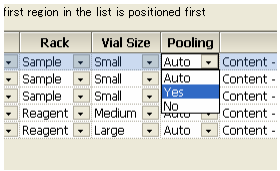
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

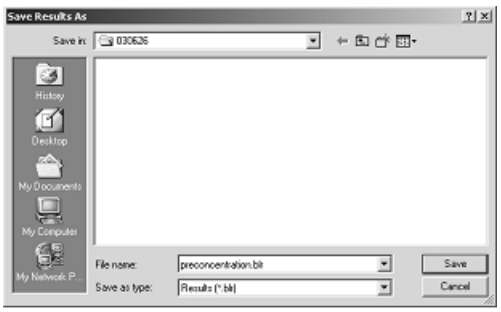
↓

Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする↓

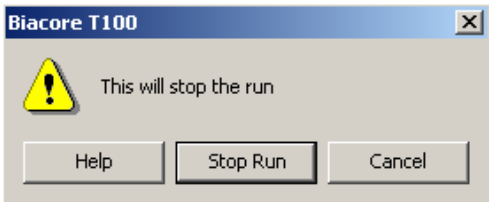
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

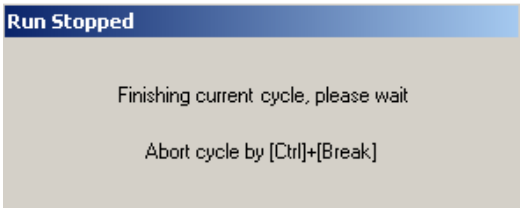
補足 5-5. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓



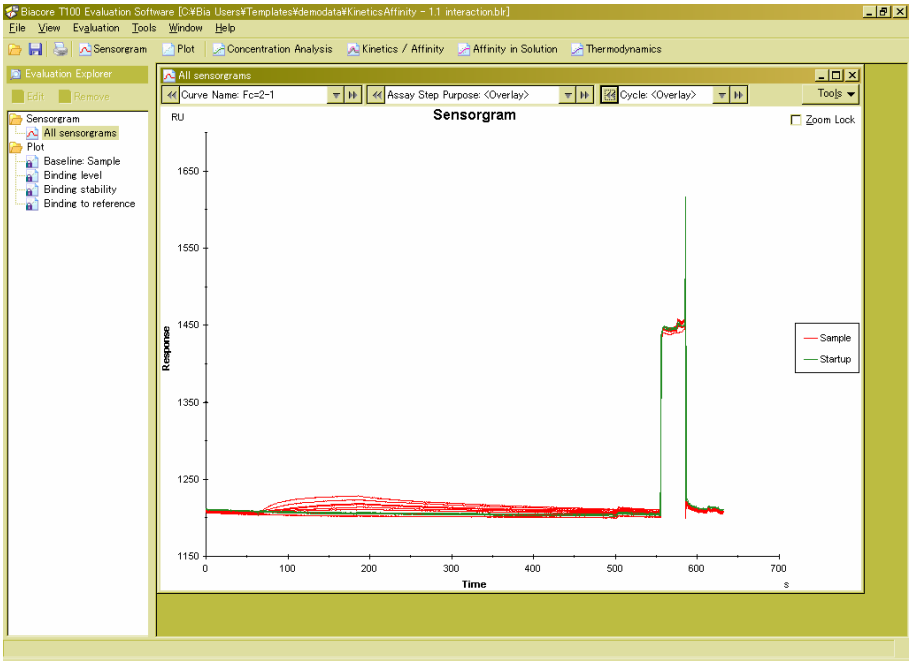
実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。

上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。

終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

5-1-2. カーブフィッティングによる解析

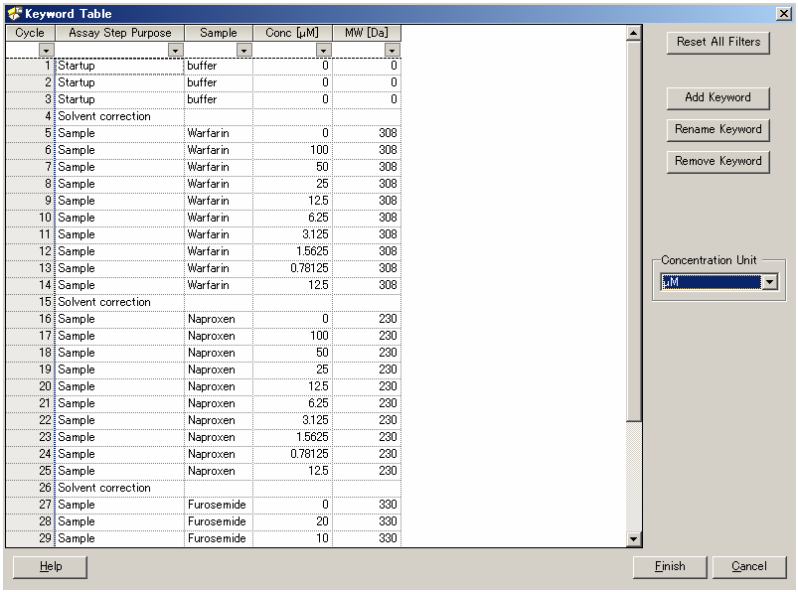
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



補足 5-6. サンプル情報の変更

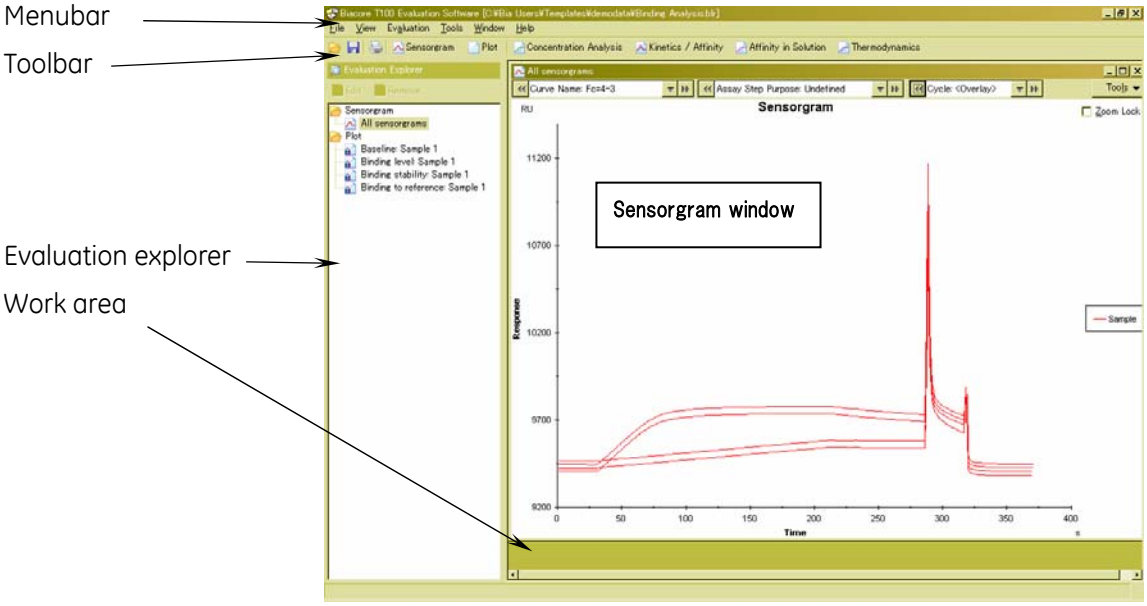
サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



Cycle	Assay Step Purpose	Sample	Conc [µM]	MW [Da]
1	Startup	buffer	0	0
2	Startup	buffer	0	0
3	Startup	buffer	0	0
4	Solvent correction			
5	Sample	Warfarin	0	308
6	Sample	Warfarin	100	308
7	Sample	Warfarin	50	308
8	Sample	Warfarin	25	308
9	Sample	Warfarin	12.5	308
10	Sample	Warfarin	6.25	308
11	Sample	Warfarin	3.125	308
12	Sample	Warfarin	1.5625	308
13	Sample	Warfarin	0.78125	308
14	Sample	Warfarin	12.5	308
15	Solvent correction			
16	Sample	Naproxen	0	230
17	Sample	Naproxen	100	230
18	Sample	Naproxen	50	230
19	Sample	Naproxen	25	230
20	Sample	Naproxen	12.5	230
21	Sample	Naproxen	6.25	230
22	Sample	Naproxen	3.125	230
23	Sample	Naproxen	1.5625	230
24	Sample	Naproxen	0.78125	230
25	Sample	Naproxen	12.5	230
26	Solvent correction			
27	Sample	Furosemide	0	330
28	Sample	Furosemide	20	330
29	Sample	Furosemide	10	330

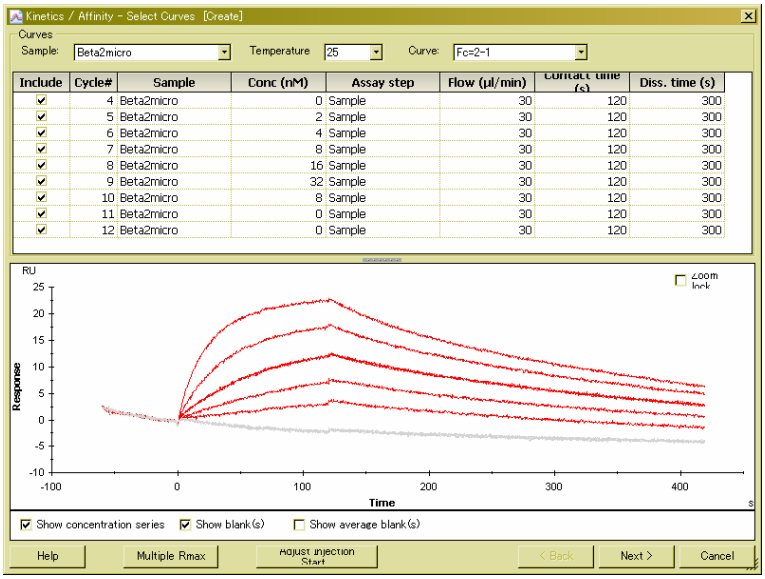
補足 5-7. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

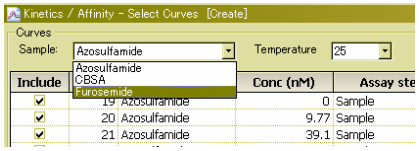
Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

↓

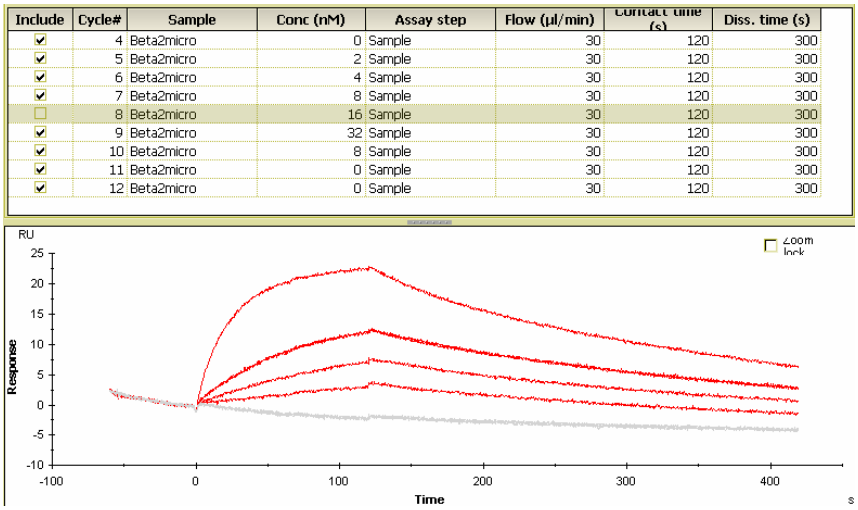


同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示される。

複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の ▼ をクリックすると、別サンプルのデータに移行できる。



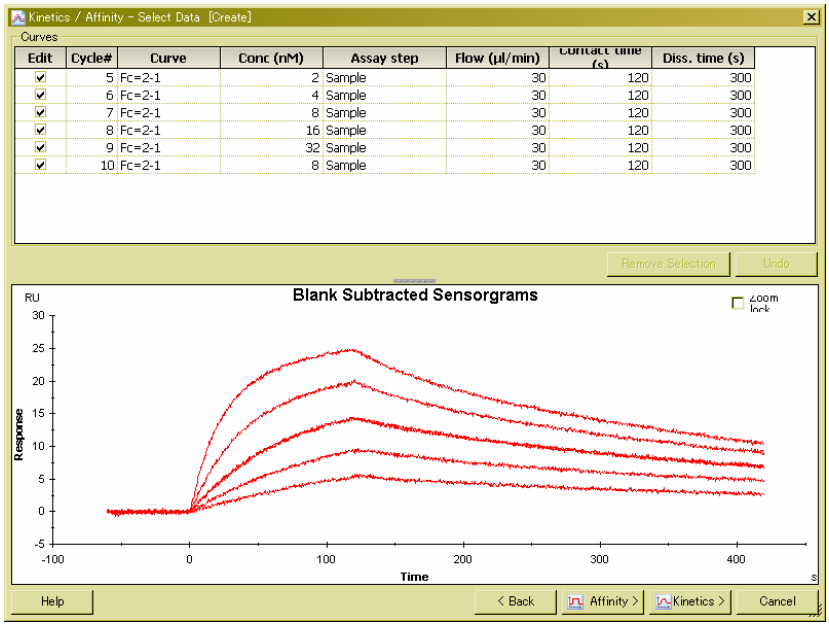
エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックをはずす。



自動的にテーブル下のチャートから、チェックをはずしたセンサーグラムは消える。

Next >をクリックする。

↓

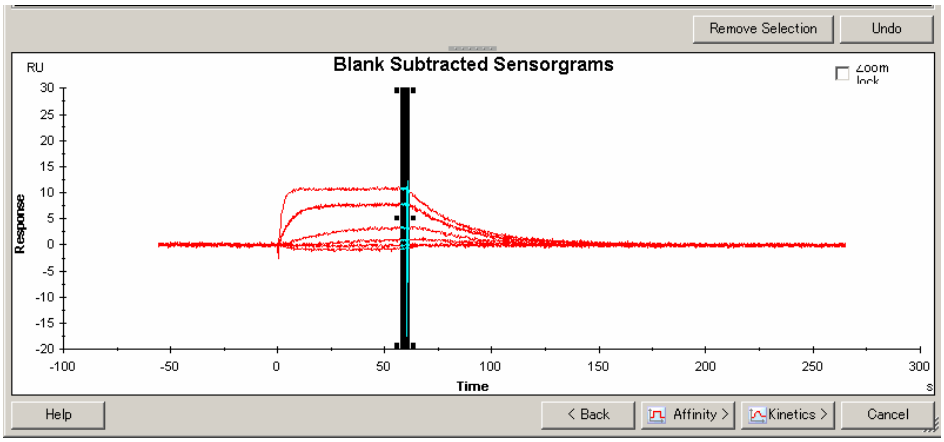


濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。

Kinetics >をクリックする。

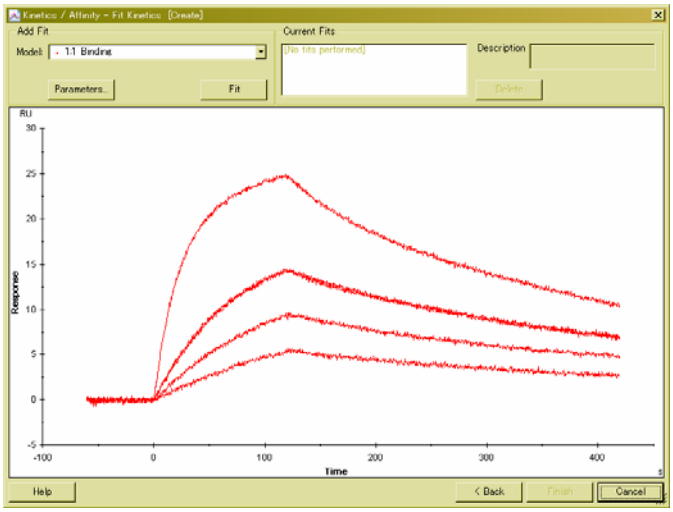
補足 5-8. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入などが理由で、解析データの中から一部削除したい領域がある場合は、マウスの右ボタンをドラッグし、削除したい領域を拡大したのち、マウスの左ボタンをドラッグして、削除領域を選択する。拡大図を解除する場合は、白い部分をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。

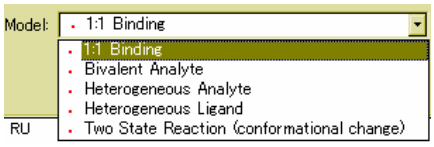


領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになる。ボタンをクリックすると、データが削除される。

↓



Model:に、フィッティングに採用する反応モデル式を選択する。 をクリックすると、すべての反応モデルが表示される。反応モデルが不明な場合は、1:1 Binding を選択する。



選択後、**Fit** をクリックする。

補足 5-9. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とする。

1:1 Binding

リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合する最も単純な反応モデル。

A + B ⇔ AB

Bivalent Analyte

アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB' 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

A + B' ⇔ AB', AB' + B' ⇔ B'AB'

Heterogeneous Analyte

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B

Heterogeneous Ligand

アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2

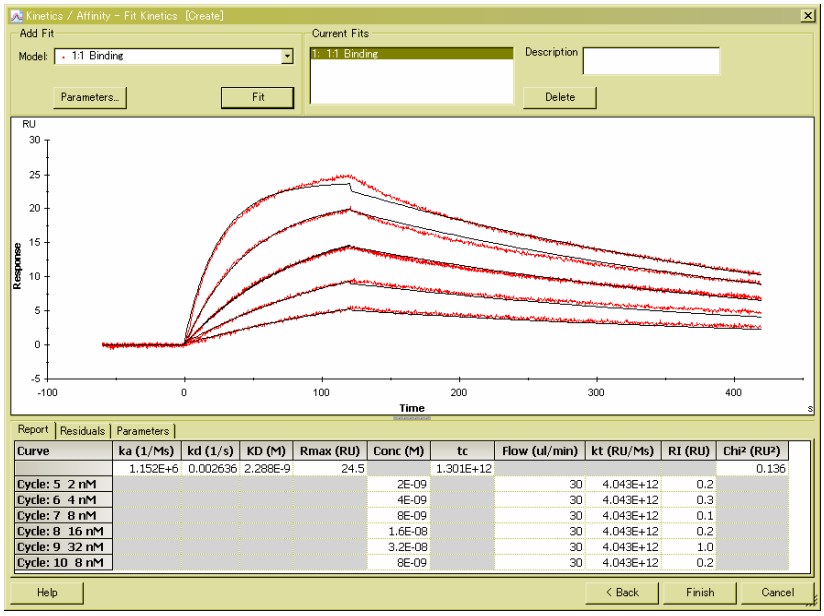
Two state Reaction (conformation chande)

リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

A + B ⇔ AB ⇔ AB*

↓

解析結果が表示される。


Kinetics / Affinity - Fit Kinetics [Create]
Add Fit
Model: 1:1 Binding
Parameters...
Fit
Current Fits
1: 1:1 Binding
Description
Delete
RU
Response
Time
Report
Residuals
Parameters
Curve | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) | Rmax (RU) | Conc (M) | tc | Flow (ul/min) | kt (RU/Ms) | RI (RU) | Chi² (RU²)
1.152E+6 | 0.002636 | 2.288E-9 | 24.5 | 1.301E+12 | 0.136
Cycle: 5 2 nM | 2E-09 | 30 | 4.043E+12 | 0.2
Cycle: 6 4 nM | 4E-09 | 30 | 4.043E+12 | 0.3
Cycle: 7 8 nM | 8E-09 | 30 | 4.043E+12 | 0.1
Cycle: 8 16 nM | 1.6E-08 | 30 | 4.043E+12 | 0.2
Cycle: 9 32 nM | 3.2E-08 | 30 | 4.043E+12 | 1.0
Cycle: 10 8 nM | 8E-09 | 30 | 4.043E+12 | 0.2
Help
< Back
Finish
Cancel

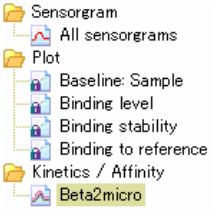
黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより得られたセンサーグラムである。テーブルには、算出された各種パラメータが表示される。

k_a(1/Ms)	結合速度定数
k_d(1/s)	解離速度定数
Rmax(RU)	アナライトの結合最大量
RI(RU)	溶液効果（bulk effect）
K_D(M)	解離定数
Chi^2(RU^2)	カイ二乗

Finish をクリックする。

↓

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。



引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

補足 5-10. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られた黒色のセンサーグラムがほぼ重なる。特に、センサーグラムの傾きに注意して判断する。傾きが見るからに異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断する。また、解析結果の RI 値が 0(RU)に近いか確認する。

フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる 等

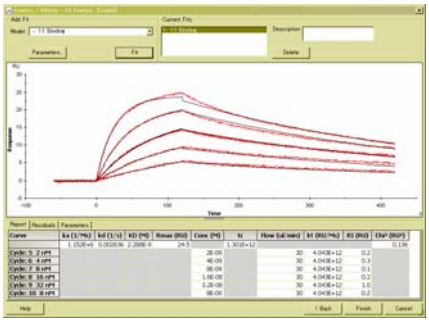
①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析する。

②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがある。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからである。この場合は、RI=0 を手入力し、再解析する必要がある。

複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, Rmax が同一のパラメータであることが前提となる。しかし、上記③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずしも一致しない。例えば、Rmax は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系が組めている場合は、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値である。ところが、アナライトの再生が不十分であったり、再生操作によりリガンドの活性がサイクル毎に低下している場合には、Rmax はサイクル毎に低下する。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに Rmax にある場合は、Rmax が同一パラメータであることを解除し再解析する。

補足 5-11. カーブフィッティングにおける再解析

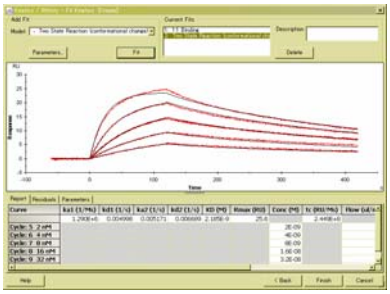
反応モデルの変更



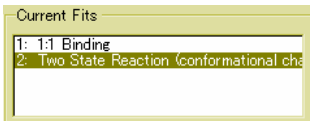
反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の ▼ をクリックし、新しい反応モデルを選択する。**Fit** をクリックする。

↓

新しい解析結果が表示される。

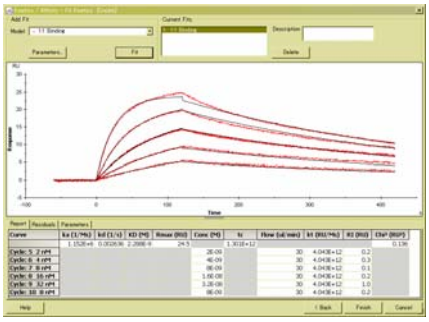


解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残る。



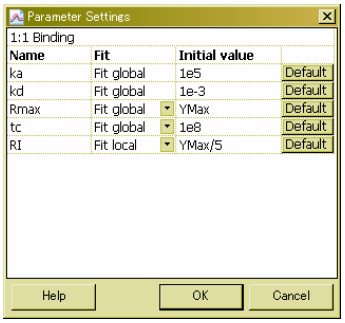
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示される。終了後、**Finish** をクリックする。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（Rmax,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックする。

↓

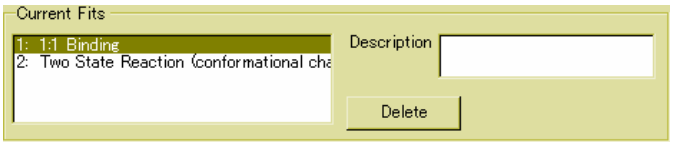


経時的なリガンドの活性低下や再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、Rmax を同一パラメータとみなせない場合、Rmax の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Fit local** を選択する。
箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているのにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Constant** を選択する。Initial value は自動的に 0 が入力される。

Parameter Setting ボックス中の **OK** をクリックすると、条件が適用される。
引き続き、**Fit** をクリックすると、解析結果が表示される。

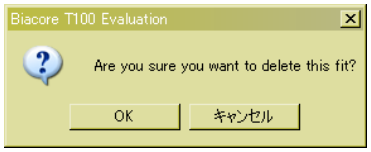
補足 5-12. 解析履歴からの結果の消去

解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択する。



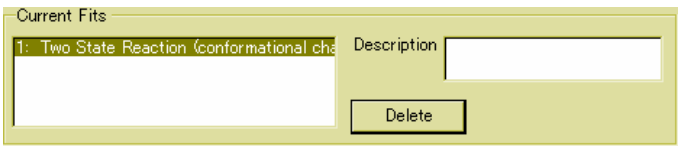
Delete をクリックする。

↓



確認ボックスが表示される。
消去する場合は **OK** をクリックする。

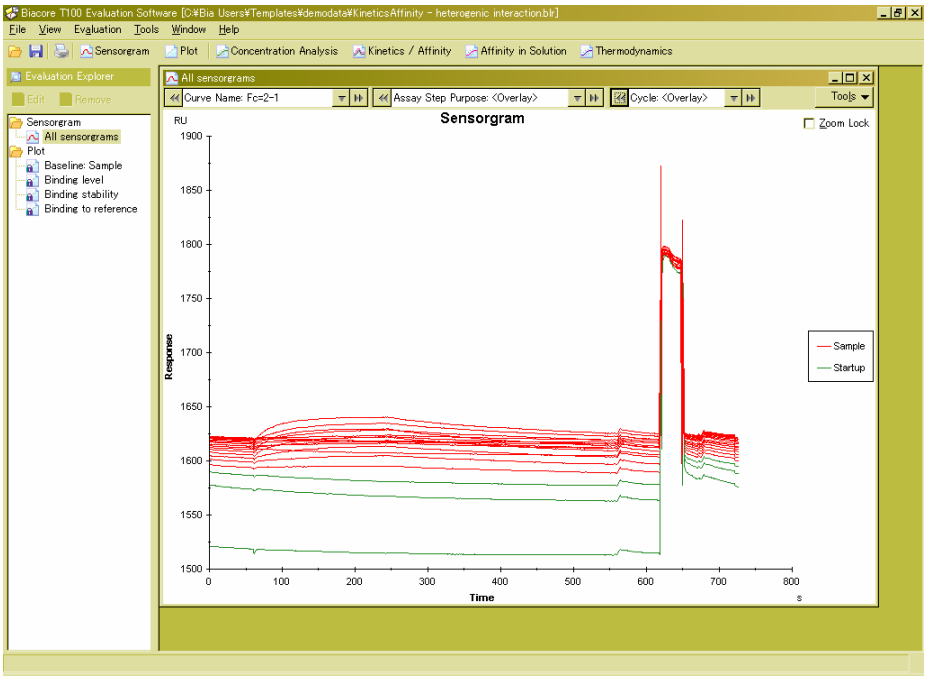
↓



解析結果が **Current Fits** ボックスから消去される。

5-1-3. 平衡値解析

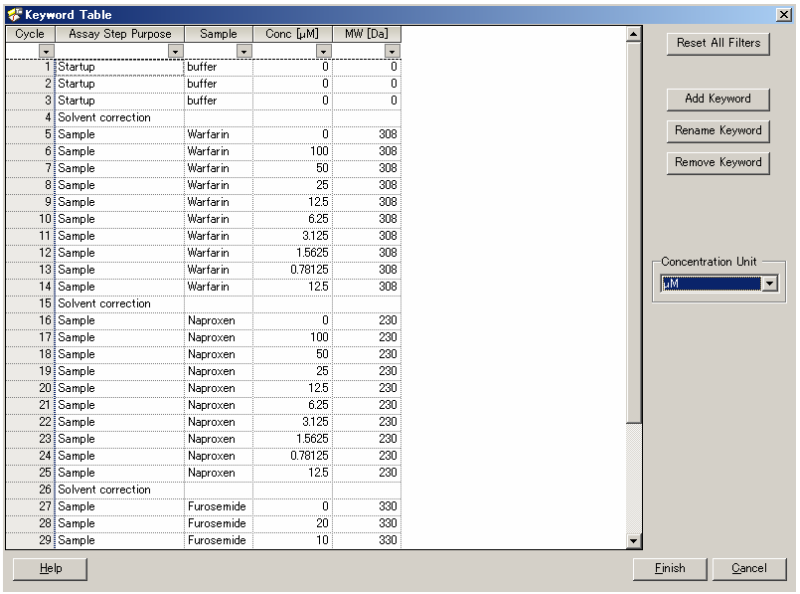
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



補足 5-13. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

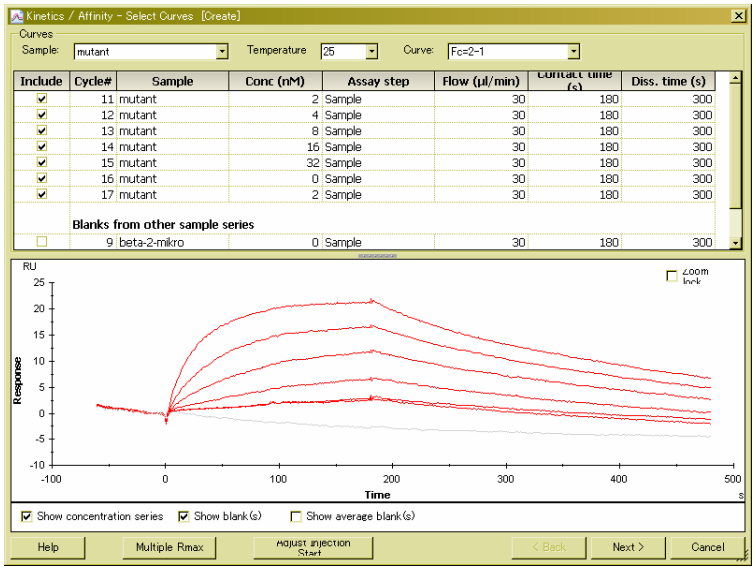
Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



Cycle	Assay Step Purpose	Sample	Conc [µM]	MW [Da]
1	Startup	buffer	0	0
2	Startup	buffer	0	0
3	Startup	buffer	0	0
4	Solvent correction			
5	Sample	Warfarin	0	308
6	Sample	Warfarin	100	308
7	Sample	Warfarin	50	308
8	Sample	Warfarin	25	308
9	Sample	Warfarin	12.5	308
10	Sample	Warfarin	6.25	308
11	Sample	Warfarin	3.125	308
12	Sample	Warfarin	1.5625	308
13	Sample	Warfarin	0.78125	308
14	Sample	Warfarin	12.5	308
15	Solvent correction			
16	Sample	Naproxen	0	230
17	Sample	Naproxen	100	230
18	Sample	Naproxen	50	230
19	Sample	Naproxen	25	230
20	Sample	Naproxen	12.5	230
21	Sample	Naproxen	6.25	230
22	Sample	Naproxen	3.125	230
23	Sample	Naproxen	1.5625	230
24	Sample	Naproxen	0.78125	230
25	Sample	Naproxen	12.5	230
26	Solvent correction			
27	Sample	Furosemide	0	330
28	Sample	Furosemide	20	330
29	Sample	Furosemide	10	330

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

↓

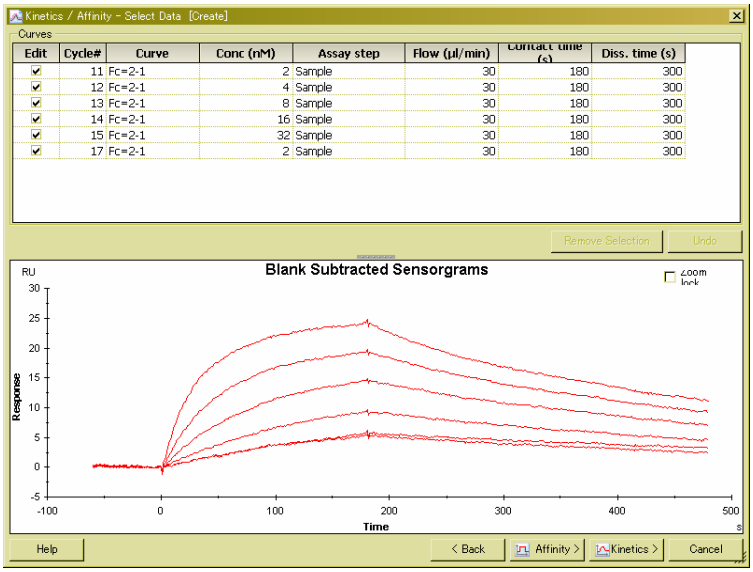


同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示される。複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別サンプルのデータに移行できる。

エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックをはずす。

Next >をクリックする。

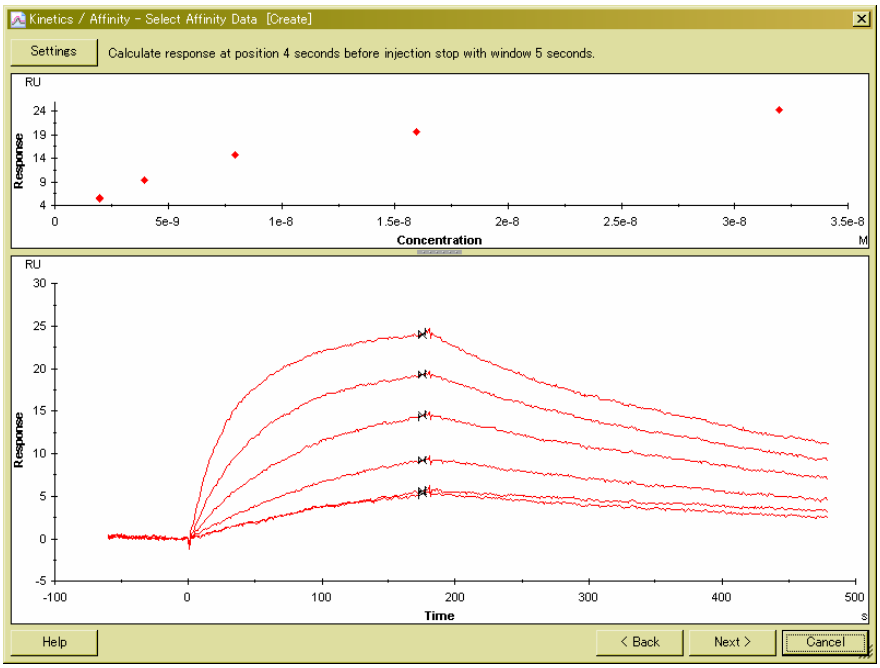
↓



濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。

Affinity >をクリックする。

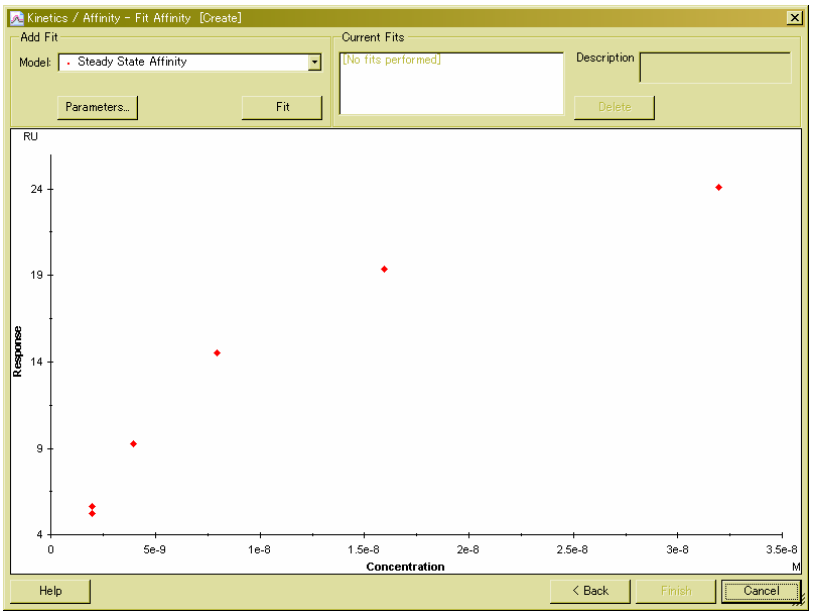
↓



アナライト添加終了直前のレスポンス（RU）を Req 値（RU）とし、各アナライト濃度における Req 値のプロットが作成される。

Next >をクリックする。

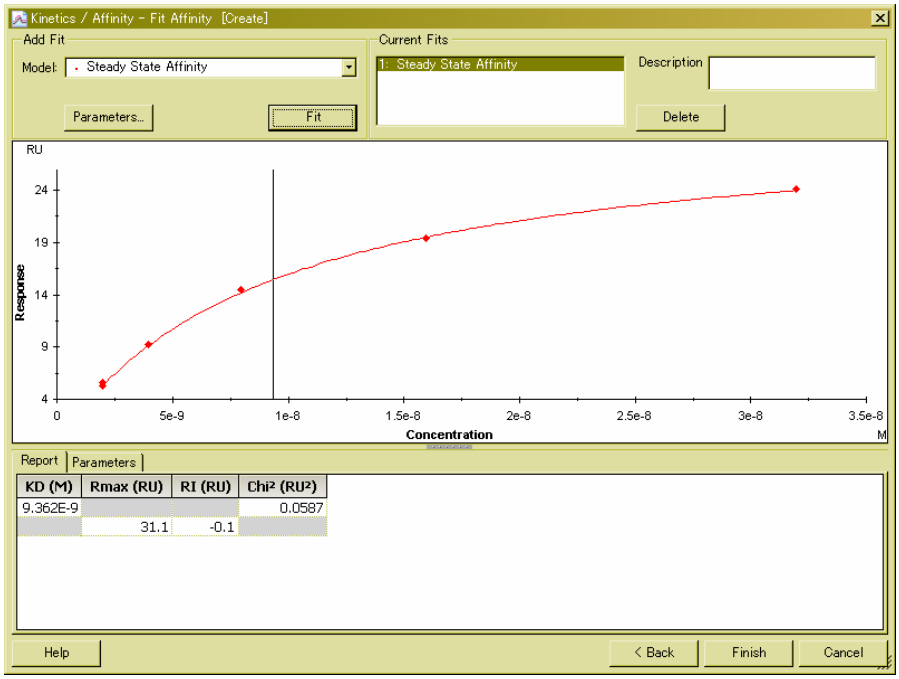
↓



各アナライト濃度における Req 値が、縦軸 RU、横軸濃度のグラフにプロットされる。

Fit をクリックする。

↓



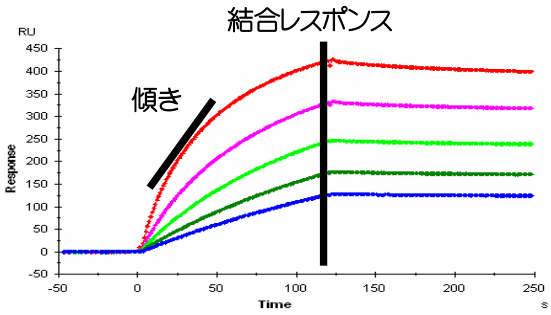
終了後、**Finish** をクリックする。
解析結果が表示される。

K_D(M)	解離定数
Rmax(RU)	アナライトの結合最大量
RI(RU)	溶液効果（bulk effect）
$Chi^2(RU^2)$	カイ二乗

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。
引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の

をクリックする。

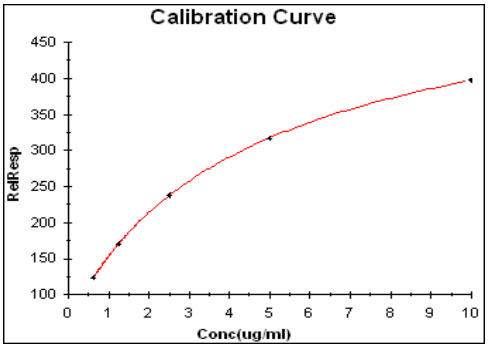
5-2. 濃度測定



Biacore による濃度測定では、定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となる。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、添加した濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られる。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成する。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることにより、濃度を算出する。
また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slop）も結合レスポンス同様に、添加している A の濃度を反映した値となるため、Slop vs C の検量線からでも定量をすることができる。

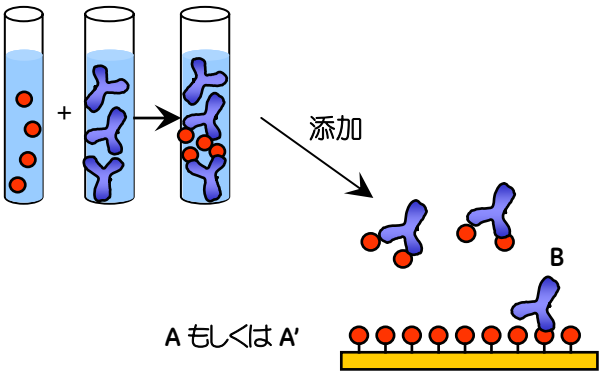
直接法と阻害法

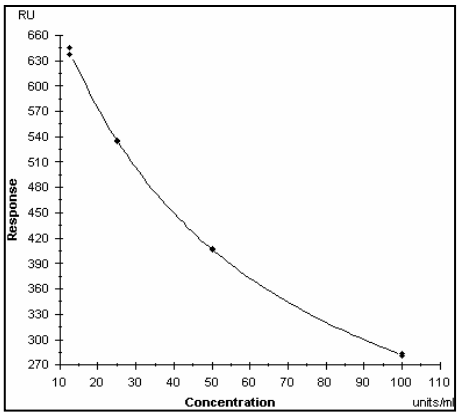
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法を**直接法**と呼ぶ。それに対し、化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定量を行う場合は、A もしくは A のアナログ（A'）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を定量することにより、混合液中に存在する A を逆算する定量法を**阻害法**と呼ぶ。



直接法による検量線

阻害法



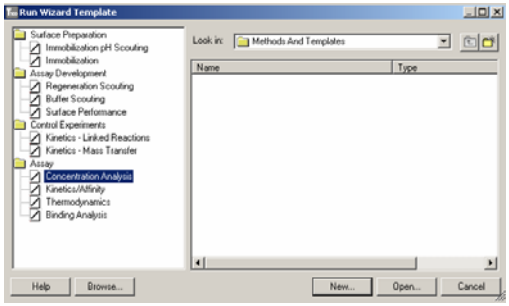


阻害法による検量線

5-2-1. プログラムの実行

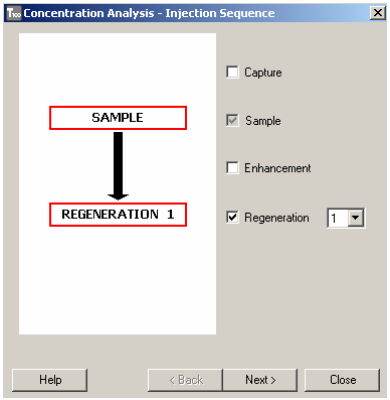
センサーチップへの非特異的吸着の影響と溶液効果を補正する目的で、リファレンスセルを差し引いたデータを利用することを推奨する。リファレンスセルをとる場合には、あらかじめウィザードの **Concentration Analysis** のテンプレートで作成したメソッドをメソッドビルダーで開き、リファレンスセルの設定を行い利用する（6 章を参照）。
ここでは、リファレンスをとらない **Concentration Analysis** について記載する。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Concentration Analysis** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。

Sample

アナライトの添加

Regeneration

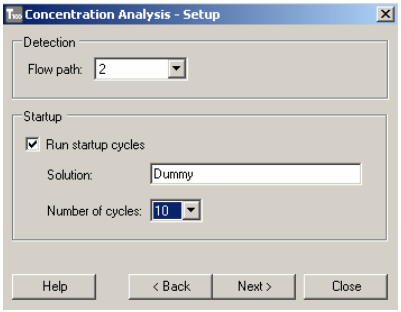
再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回もしくは 2 回の選択。

Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れる

Next >をクリックする。

↓



Detection

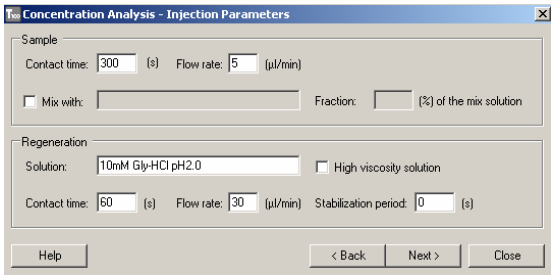
Flow path　濃度測定を行うフローセルを設定する。リファレンスセルの差し引きはできない。

Startup

Solution　指定した溶液で、サンプル測定と同様の工程をサンプル（アナライト）測定前に実施。通常、ランニング緩衝液を用い、3 回以上の実施を推奨。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓


Concentration Analysis - Injection Parameters
Sample
Contact time: 300 (s) Flow rate: 5 (µl/min)
Mix with: Fraction: (%) of the mix solution
Regeneration
Solution: 10mM Gly-HCl pH2.0
High viscosity solution
Contact time: 60 (s) Flow rate: 30 (µl/min) Stabilization period: 0 (s)
Help
< Back
Next >
Close

Sample

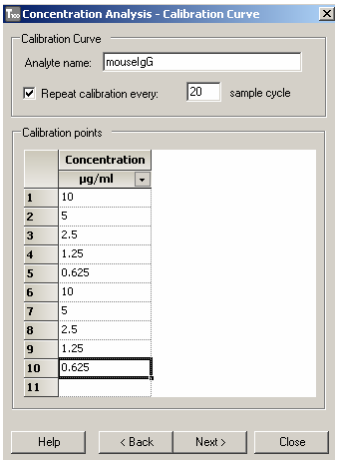
Contact time	アナライトの添加時間	300 s
Flow rate	流速	5 ul/min
Mix with	検出分子の混合（阻害法による定量の場合に使用）	

Regeneration

Solution	再生溶液の名称	
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%　エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れる	
Contact time	再生溶液の添加時間	60 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Stabilization perion	添加終了後のベースライン安定化時間	0 s

設定後、**Next >**をクリックする。

↓



Calibration Curve

Analyte name	アナライト（既知濃度サンプル）の名称
Repeat calibration every	既知濃度サンプルの検量線作成頻度

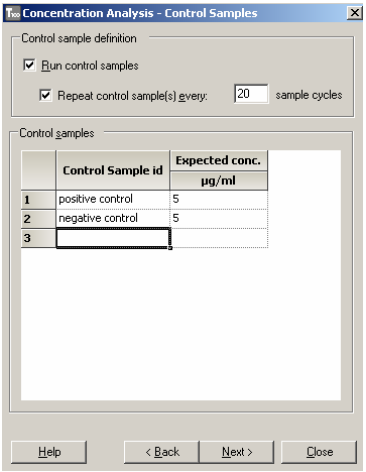
Calibration points

Concentration	検量線作成濃度（単位も選択） 6 段階濃度以上、測定回数 2 回以上を推奨

テーブルに入力した順番で測定は実行する。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Control sample definition

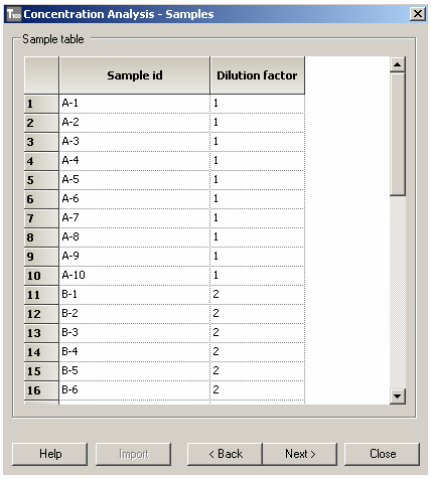
Run control sample	コントロールサンプル測定の際にチェックを入れる
Repeat sample(s) every	測定頻度を入力 コントロールは 20 サンプル程度ごとに入れる

Control samples

Control sample id	コントロールサンプルの名称
Expected conc.	コントロールサンプルの濃度

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



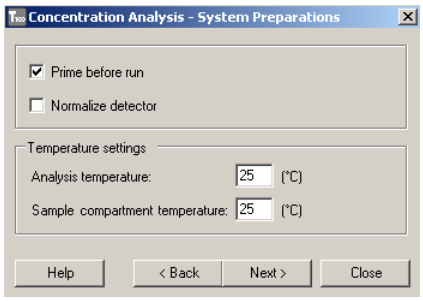
Sample id	サンプルの名称
Dilution factor	サンプルの希釈倍率

入力後、**Next >**をクリックする。

↓

補足 5-14.Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

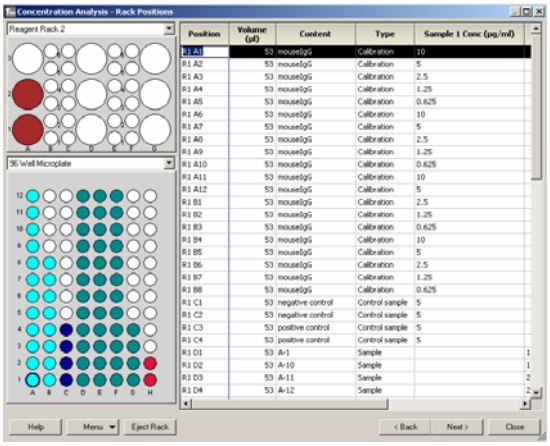


測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の選択を行う。

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Next >をクリックする。

↓



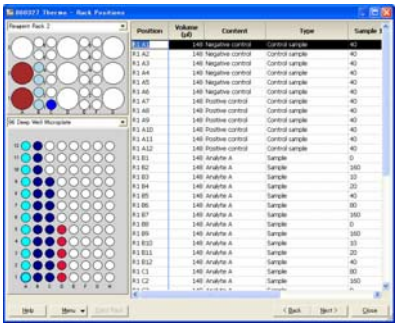
右側の表でサンプルの位置と容量（ul）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-15. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

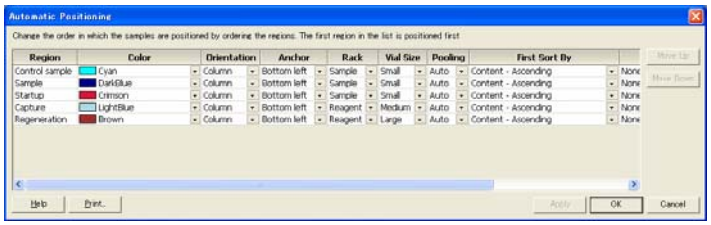
補足 5-16. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

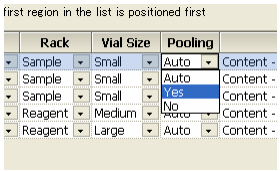
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

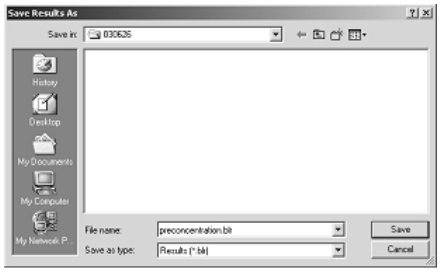
↓

基本的な共通注意事項が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

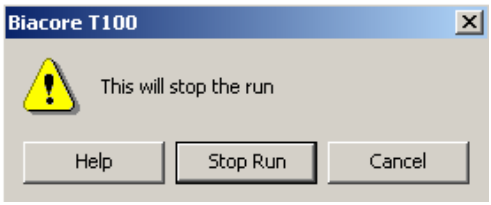
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

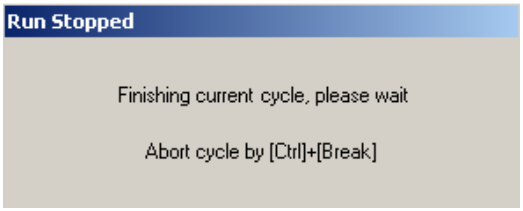
補足 5-17. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

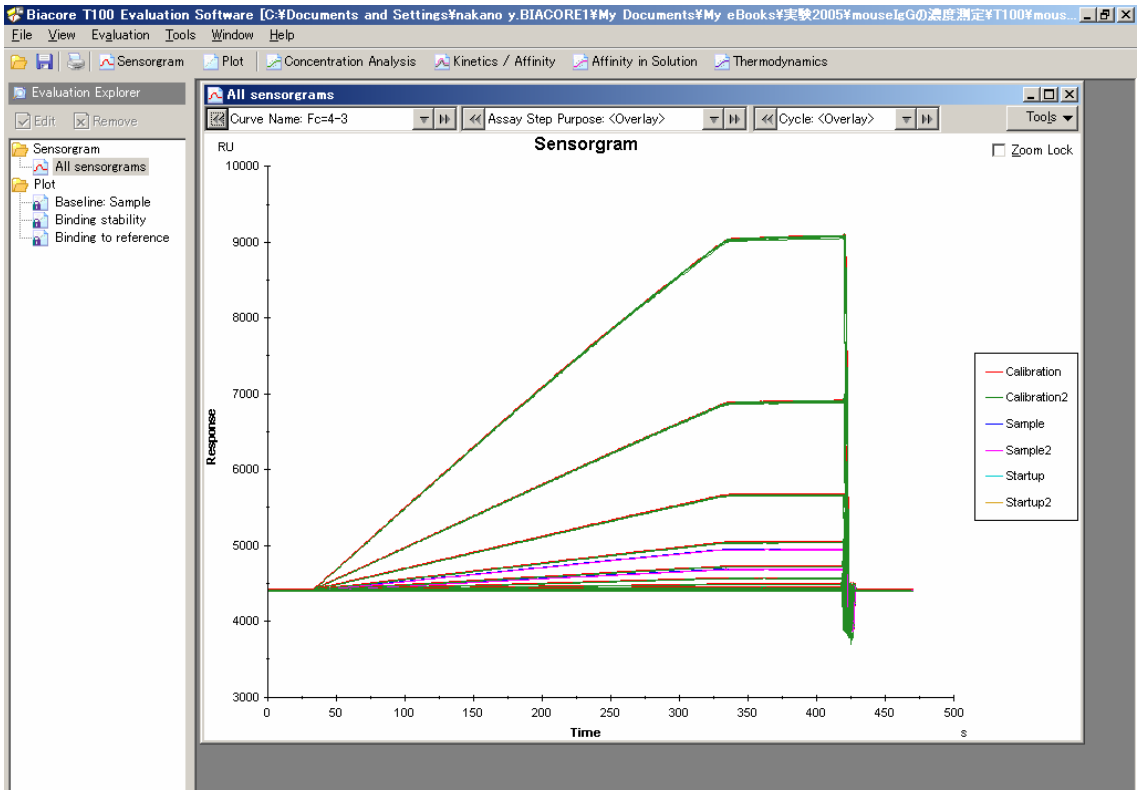
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

5-2-2. データ解析

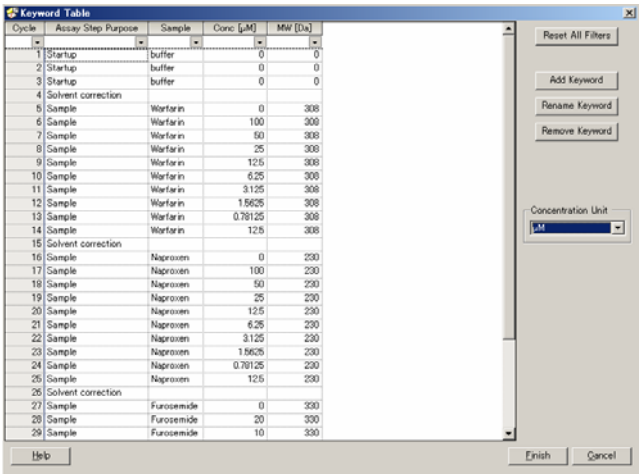
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



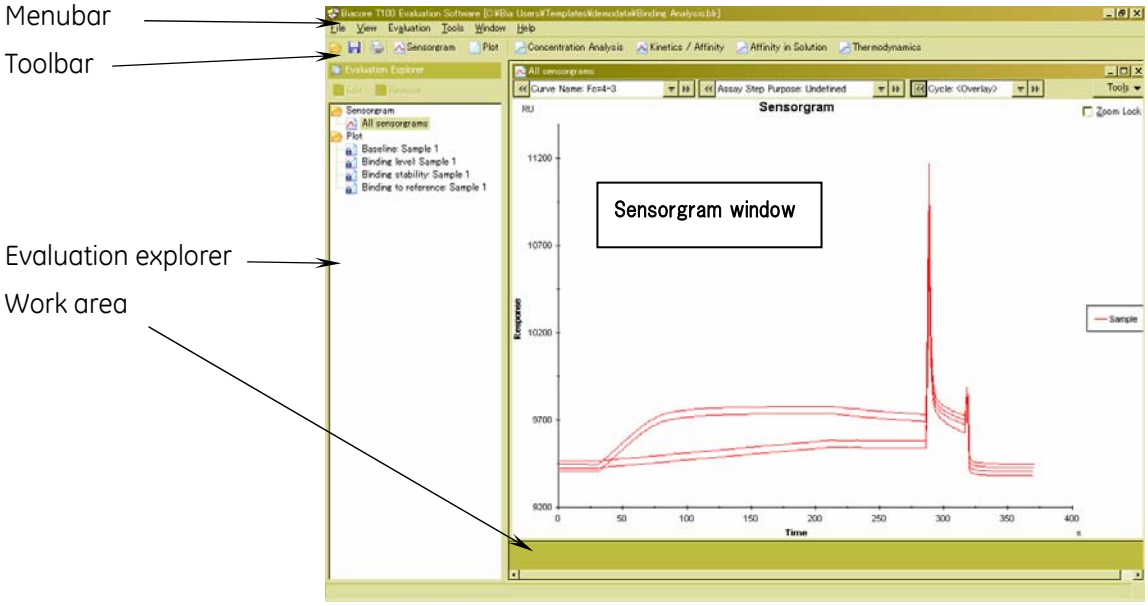
補足 5-18. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



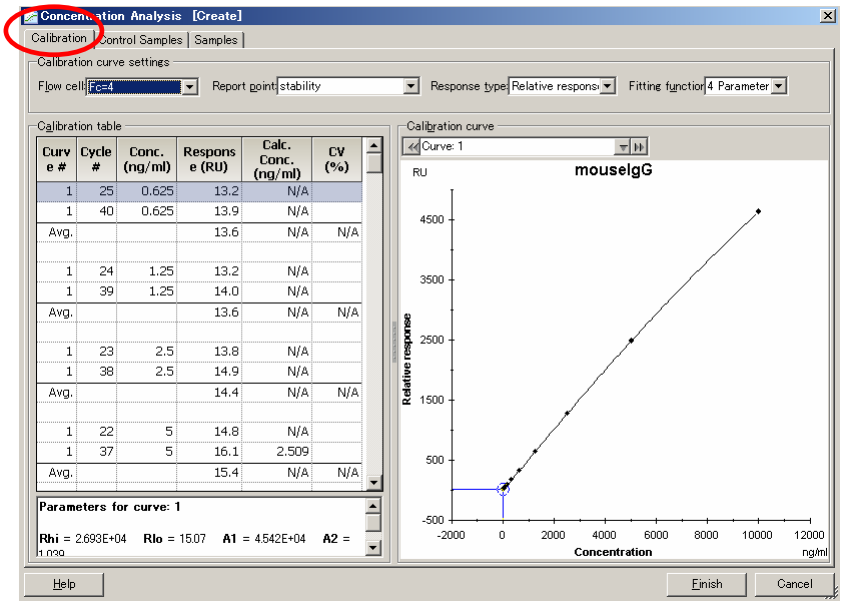
補足 5-19. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Concentration Analysis をクリックする。

↓



Concentration Analysis [Create] ボックスの Calibration のページが表示される。

Calibration の設定

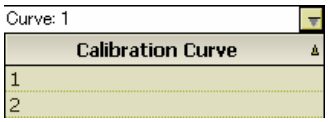
Calibration curve settings の設定ツールで、採用するフローセルやレポートポイントの位置、種類を選択する。

Flow cell	測定したセルの選択
Report point	レポートポイントの選択
Response type	結合レスポンスで濃度測定するか、傾き（Slop）で濃度測定するか選択する。

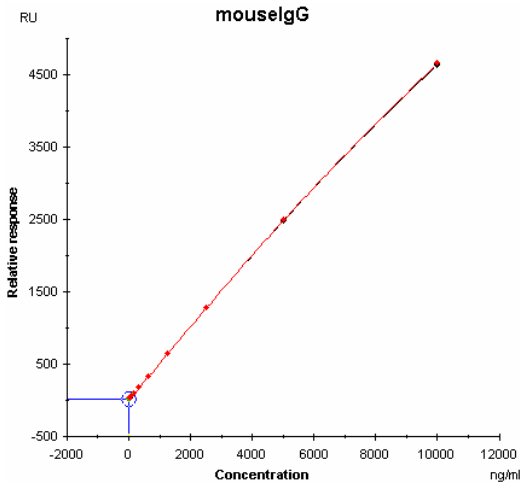
設定した条件での検量線の確認を行う。

Calibration curve Curve: 1 の もしくは をクリックし、目的のサイクルを選択する。

複数の検量線を同時に確認する場合は、 を使用する。



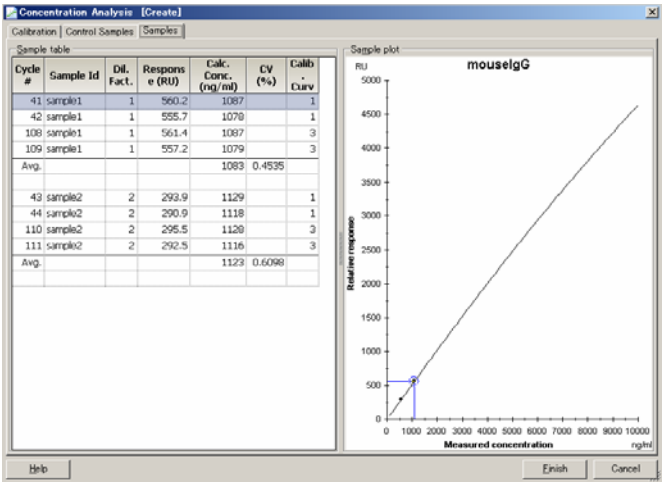
キーボードの Ctrl キーを押しながら、カラム中の目的の番号をクリックする。連続した番号を選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。



検量線の測定ポイント削除、検量線自体の削除は、補足 5-20 および 5-21 を参照のこと。

未知サンプルの測定結果

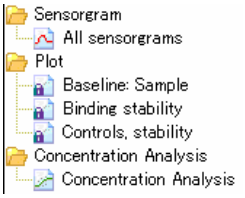
Concentration Analysis [Create] ボックス上部の Samples のタブのついたページをクリックする。



Finish をクリックする。

↓

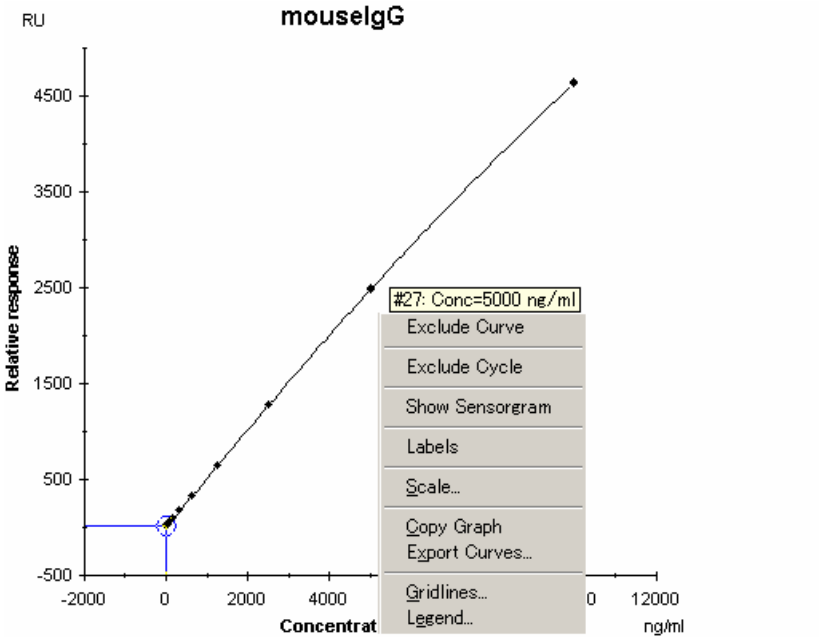
解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに保存される。



解析結果を改めて見る場合は、Evaluation Explorer の Concentration Analysis フォルダ内の目的ファイルをクリックすると表示される。

補足 5-20. 測定ポイントの削除

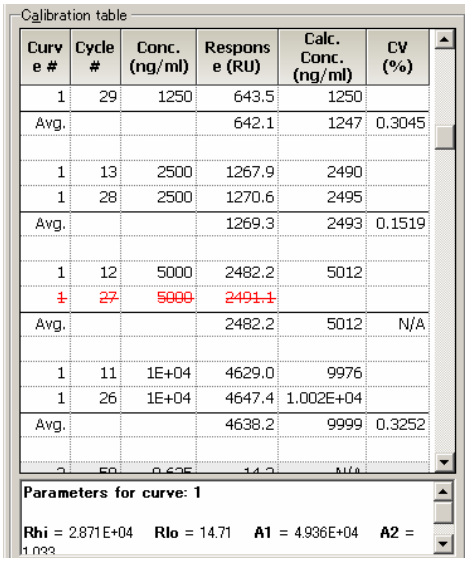
エアーの混入などの理由で、測定結果から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックする。



Exclude Cycle をクリックする。

↓

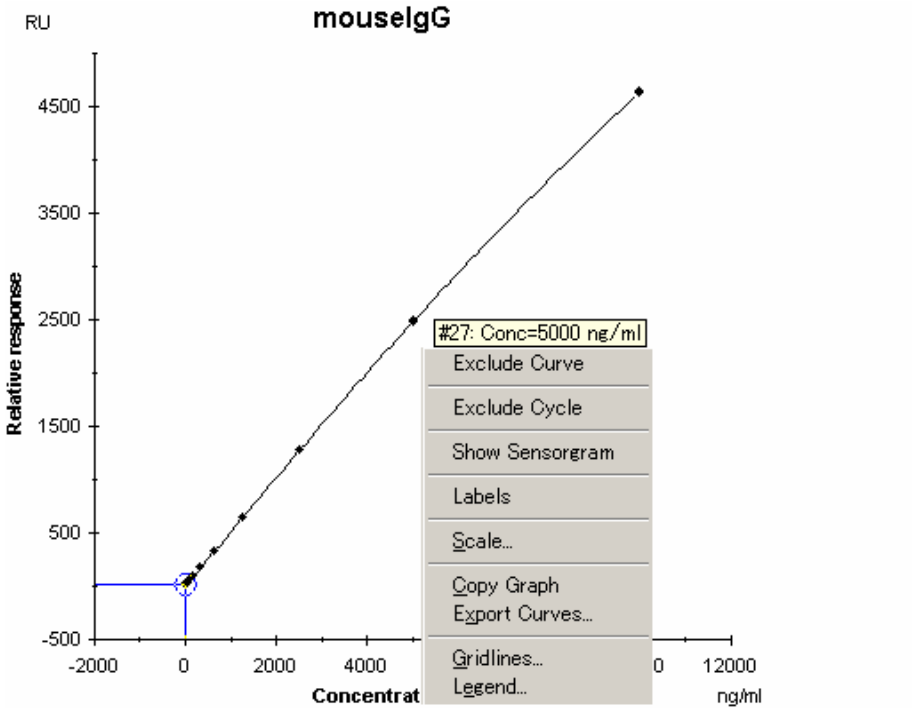
測定ポイントが削除され、同時に、Calibration table 中、削除した測定ポイントには赤色の削除ラインが引かれる。



削除した測定ポイントが検量線に関与する場合は、改めて残りの測定ポイントで検量線が作り直される。

補足 5-21. 検量線の削除

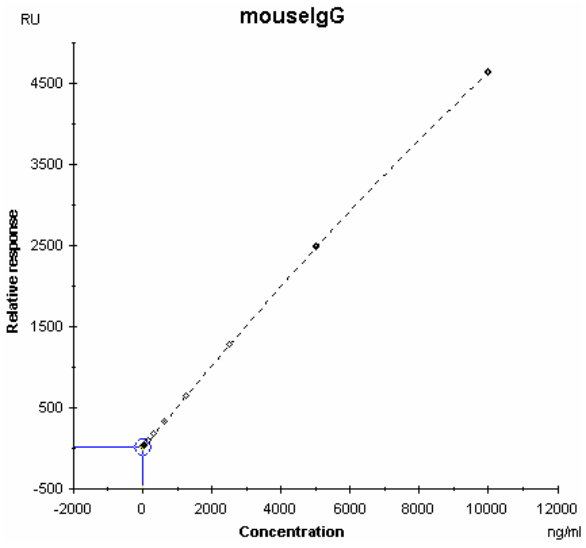
エアーの添加などの理由で、複数回数取得している検量線のうち、解析から削除したい検量線がある場合、いずれかの測定ポイント上でマウスを右クリックする。



Exclude Curve をクリックする。

↓

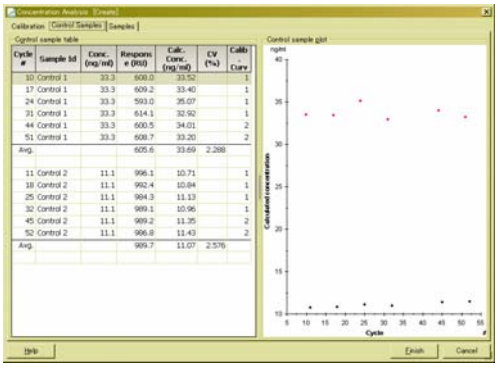
検量線は削除され、同時に、Calibration table 中、その検量線を構成している全測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれる。



Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
~~1~~	~~25~~	~~0.625~~	~~13.2~~		
~~1~~	~~40~~	~~0.625~~	~~13.9~~		
Avg.					
~~1~~	~~24~~	~~1.25~~	~~13.2~~		
~~1~~	~~39~~	~~1.25~~	~~14.0~~		
Avg.					
~~1~~	~~23~~	~~2.5~~	~~13.8~~		
~~1~~	~~38~~	~~2.5~~	~~14.9~~		
Avg.					
~~1~~	~~22~~	~~5~~	~~14.8~~		
~~1~~	~~37~~	~~5~~	~~16.1~~		
Avg.					

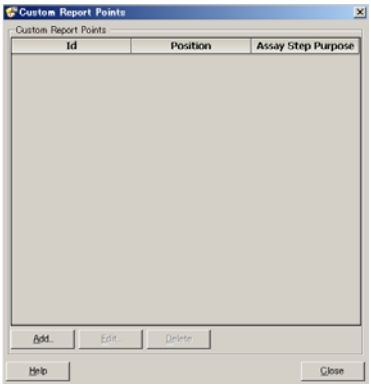
補足 5-22. コントロールサンプルのレスポンスのチェック

定期的にコントロールサンプルを添加している場合、その結合レスポンスを **Concentration Analysis [Create]** ボックス上部の **Control Sample** のタブのついたページでチェックすることができる。



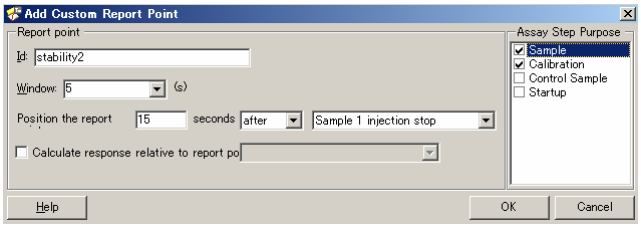
補足 5-23. レポートポイントの追加

Tools → **Custom Report Point...** をクリックする。



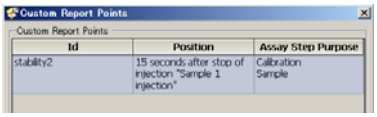
Add... をクリックする。

↓



名称、追加する位置、どのステップのレスポンスを記録するか設定し、**OK** をクリックする。

↓

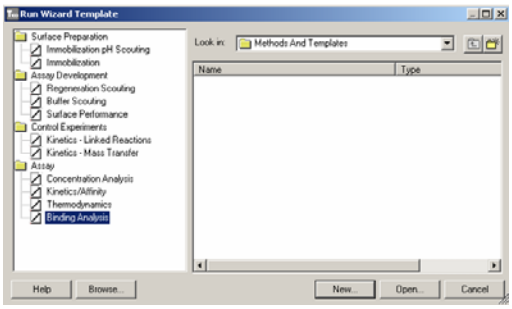


初期画面に、追加したレポートポイントが表示される。

5-3. 結合の有無の確認、スクリーニング

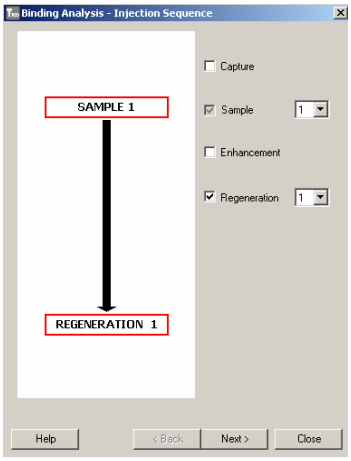
5-3-1. プログラムの実行

Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Binding Analysis** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

Sample

アナライトの添加。複数サンプルの添加は、補足 5-24 を参照。

Regeneration

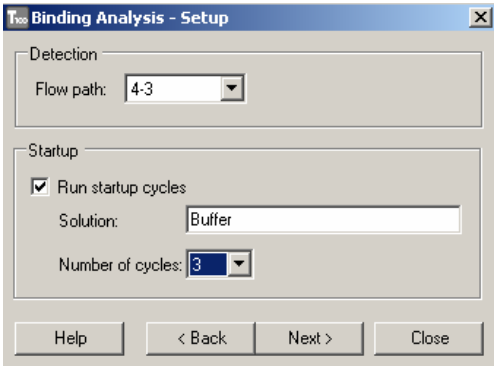
再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回もしくは 2 回の選択をする。

Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れる。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Detection

Flow path　測定を行うフローセルを設定する。
リファレンスの差し引き機能を利用する。キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 のみの選択となる。

Startup

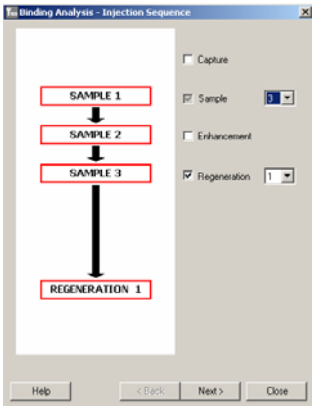
Solution　指定した溶液で、サンプル測定と同様の工程を実施する。通常はランニング緩衝液を用いる。3 回以上の設定を推奨する。

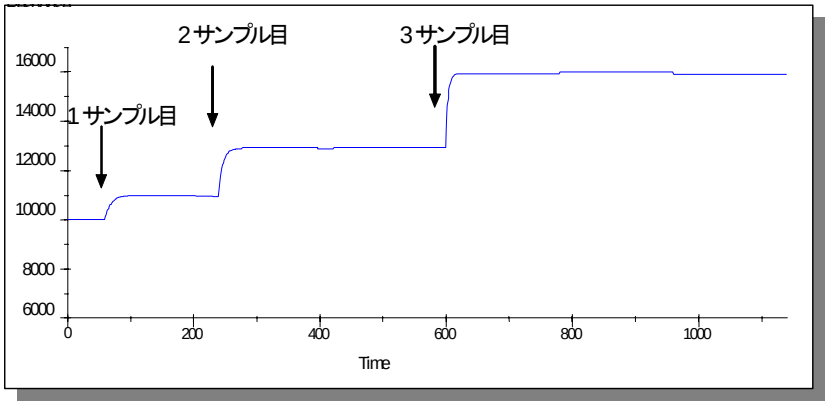
Next >をクリックする。

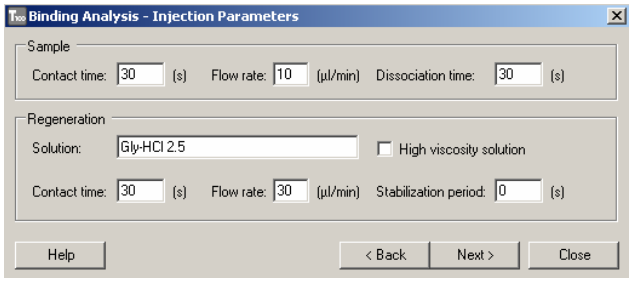
↓

補足 5-24. 複数サンプルの連続添加

エピトープマッピング等多段階の相互作用を検証する場合は、**Sample** 右のカラムで添加サンプル数を選択する。最大4サンプルまでの添加が可能である。







Sample

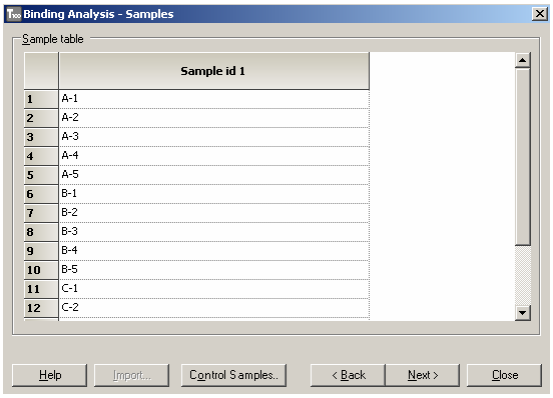
Contact time	アナライトの添加時間	30 s
Flow rate	流速	10 ul/min
Dissociation time	解離時間	30 s

Regeneration

Solution	再生溶液の名称	
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%　エチレングリコール以上）の場合は選択する	
Contact time	再生溶液の添加時間	30 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Stabilization period	添加後のベースラインの安定化時間	0 s

設定後、**Next >**をクリックする。

↓



Sample id　アナライトの名称

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、**Control Samples...**をクリックする。

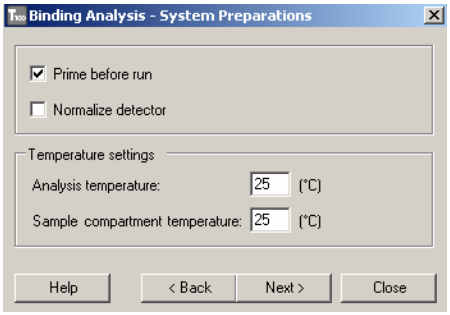
20 サンプル程度ごとに入れることが多い。

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-25.Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓



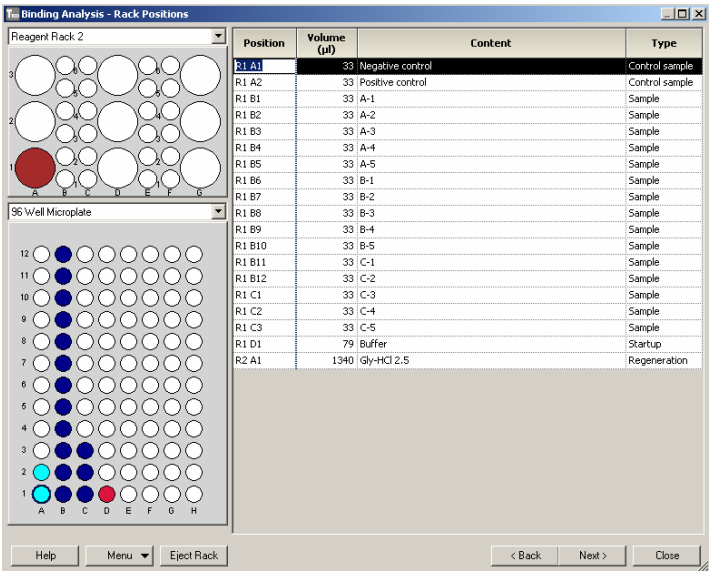
測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Analysis temperature　25 ℃

Sample compartment temperature　25 ℃

Next >をクリックする。

↓


Binding Analysis - Rack Positions
Reagent Rack 2
96 Well Microplate
Position
Volume (µl)
Content
Type
R1 A1 33 Negative control Control sample
R1 A2 33 Positive control Control sample
R1 B1 33 A-1 Sample
R1 B2 33 A-2 Sample
R1 B3 33 A-3 Sample
R1 B4 33 A-4 Sample
R1 B5 33 A-5 Sample
R1 B6 33 B-1 Sample
R1 B7 33 B-2 Sample
R1 B8 33 B-3 Sample
R1 B9 33 B-4 Sample
R1 B10 33 B-5 Sample
R1 B11 33 C-1 Sample
R1 B12 33 C-2 Sample
R1 C1 33 C-3 Sample
R1 C2 33 C-4 Sample
R1 C3 33 C-5 Sample
R1 D1 79 Buffer Startup
R2 A1 1340 Gly-HCl 2.5 Regeneration
Help
Menu
Eject Rack
< Back
Next >
Close

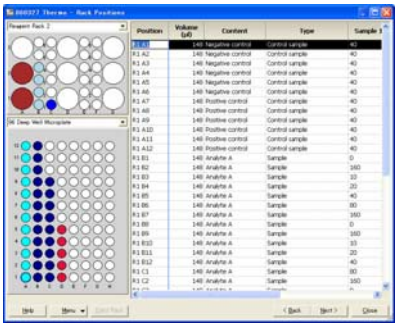
右側の表でサンプルの位置と容量(ul)を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-26. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

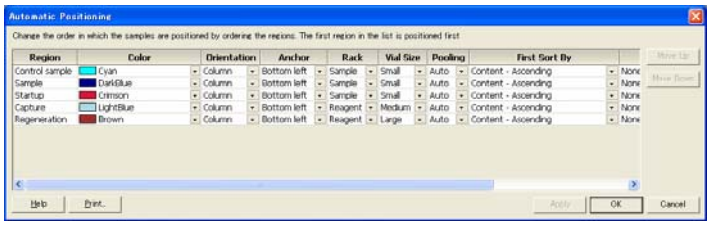
補足 5-27. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

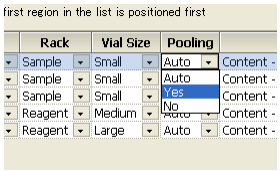
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

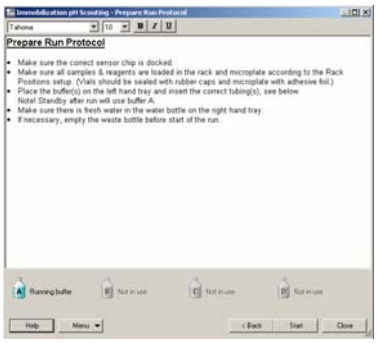
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

↓

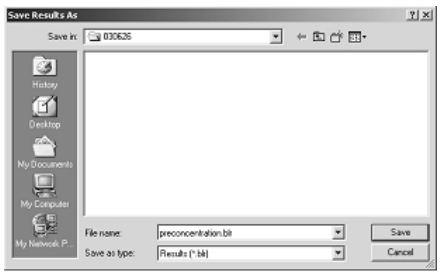


測定時の基本的な共通注意事項が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

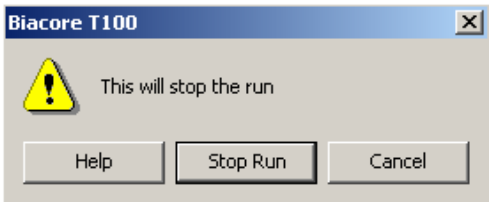
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

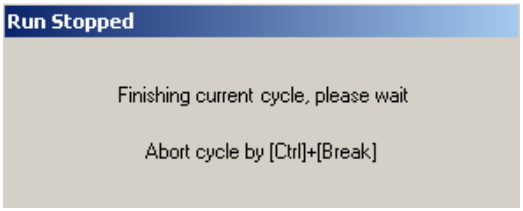
補足 5-28. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

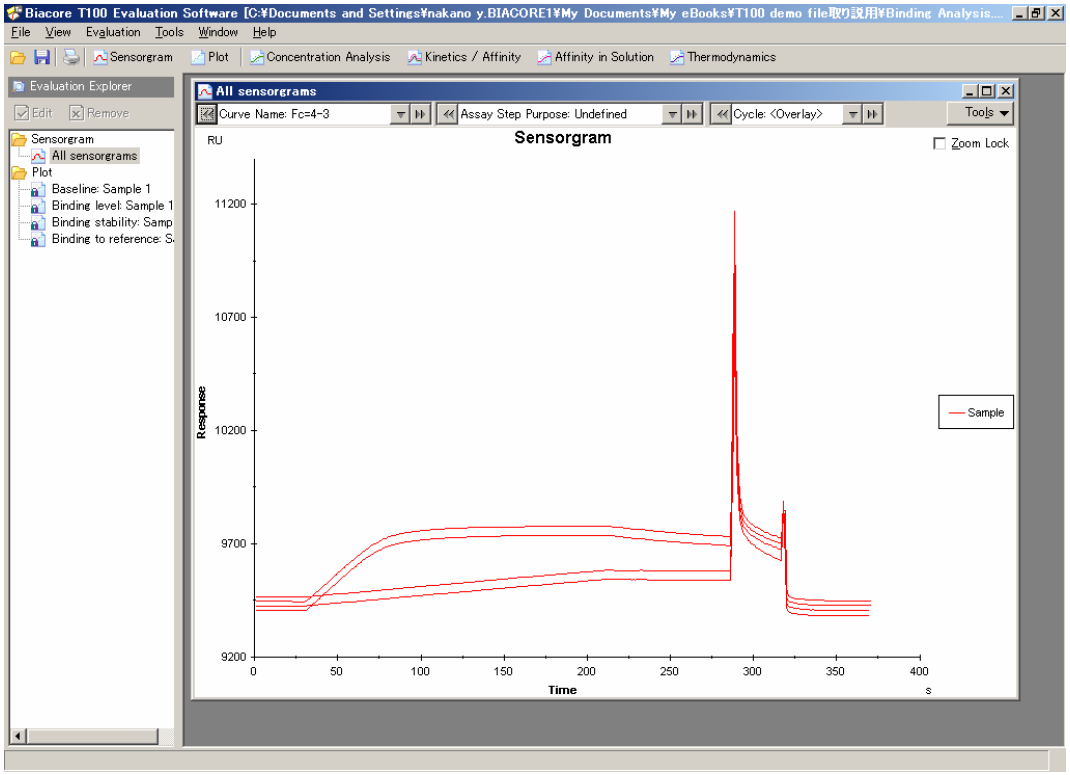
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

5-3-2. データ解析

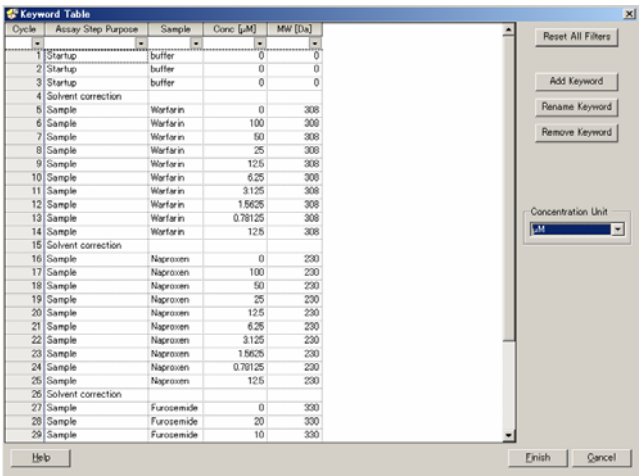
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



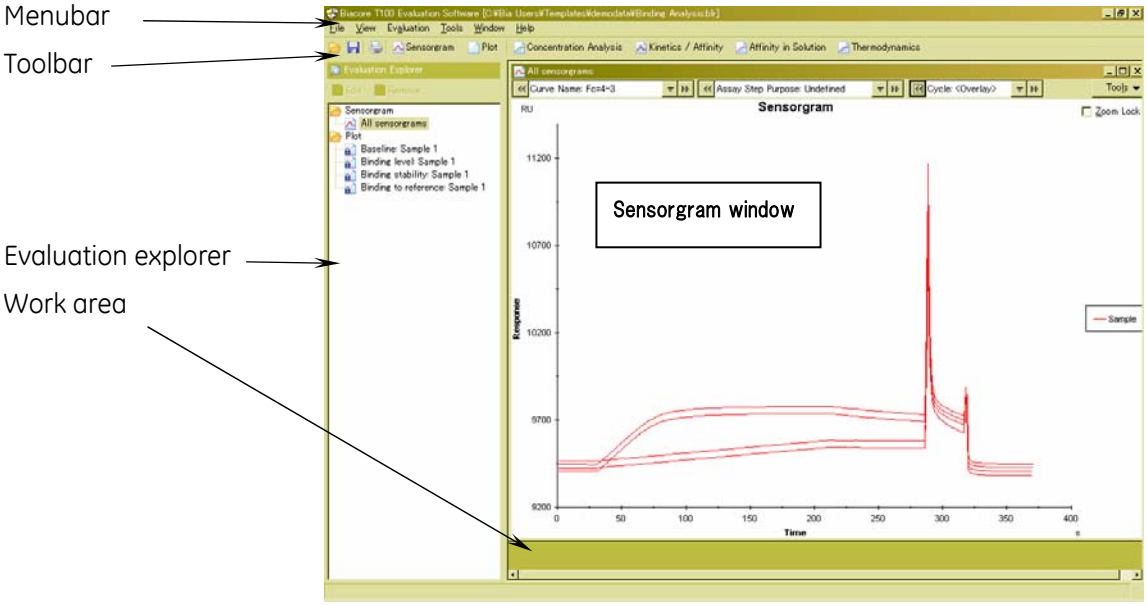
補足 5-29. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



補足 5-30. 画面の説明

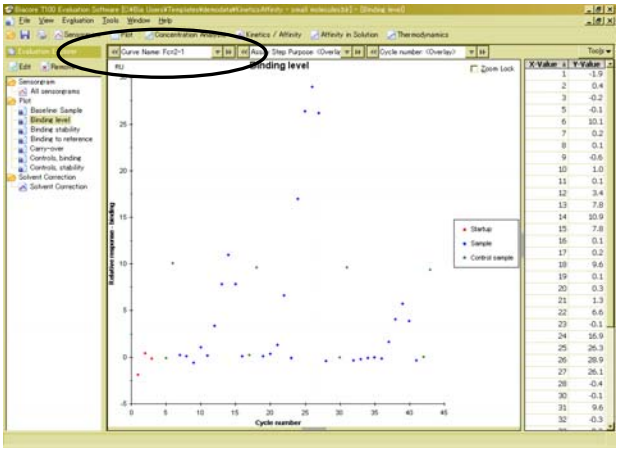


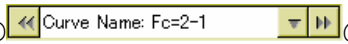
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Binding level ファイルを利用したランキングとピックアップ

Evaluation Explorer 中の Plot フォルダの **Binding level** をクリックする。

全測定サイクル分（ダミーランによる緩衝液添加、コントロールサンプル測定を含む）について、サンプル添加終了直前の結合レスポンスのプロットとテーブルが表示される。



プロット上部の 

の もしくは をクリックし、評価したいデータを選択する。

↓

プロットの並び替えを行う場合は、右側のテーブルの

をクリックする。

カラムタイトルが、

に変更され、結合レスポンスが低い順に並び替えられる。

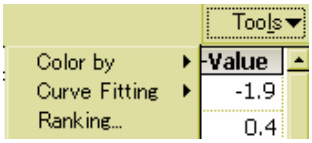
引き続き、

をクリックッすると、カラムタイトルは

に変更され、高い順に並ぶ。

↓

結合量別にピックアップを行う場合は、右テーブル上部の **Tools** をクリックする。



Rannking...をクリックする。

↓

評価基準となる結合レスポンス（RU）、非結合レスポンス（RU）等を設定する。

One Ranking Boundary

境界基準を 1 つ設定する。First value:に評価基準となる数値を入力する。

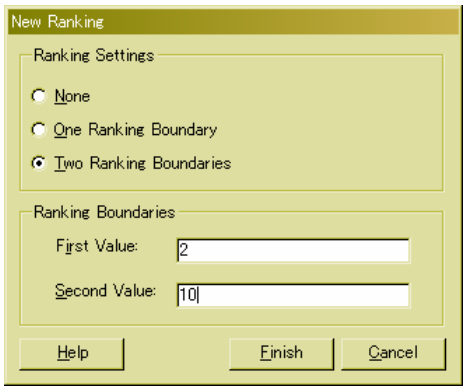
Two Ranking Boundaries

境界基準を 2 つ設定する。First value:および Second value:に評価基準となる数値を入力する。

（例）

ネガティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　2（RU）

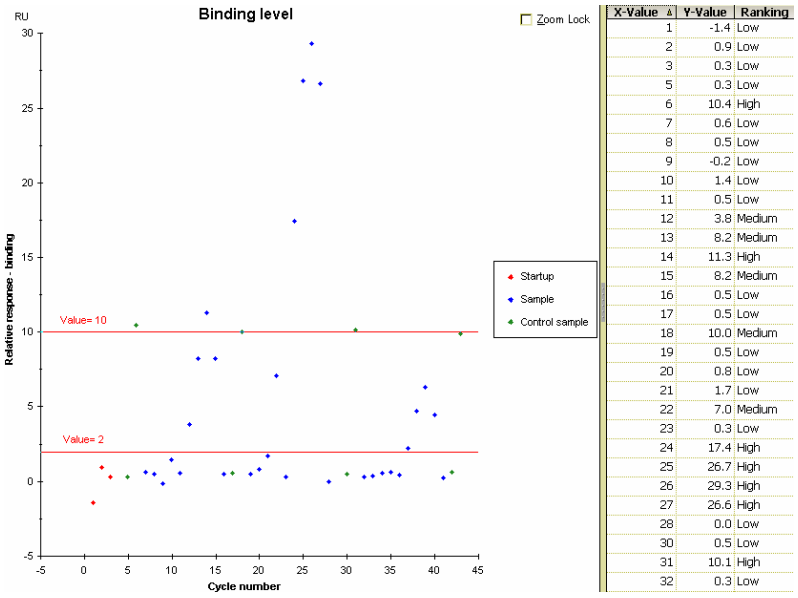
ポジティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　10（RU）



Finish をクリックする。

↓

設定した結合レスポンスの値にラインが引かれる。同時に、右表には、First value 値より結合レスポンスが低いサイクルには Low、Second value 値より高いものには High、その中間に属するものには Medium の表示が入る。



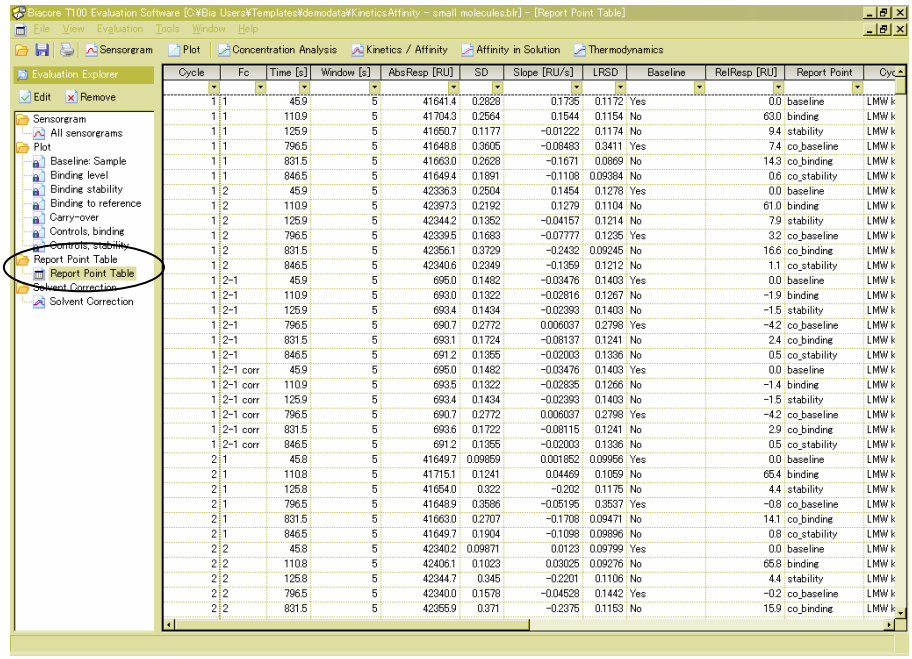
X-Value	Y-Value	Ranking
1	-1.4	Low
2	0.9	Low
3	0.3	Low
5	0.3	Low
6	10.4	High
7	0.6	Low
8	0.5	Low
9	-0.2	Low
10	1.4	Low
11	0.5	Low
12	3.8	Medium
13	8.2	Medium
14	11.3	High
15	8.2	Medium
16	0.5	Low
17	0.5	Low
18	10.0	Medium
19	0.5	Low
20	0.8	Low
21	1.7	Low
22	7.0	Medium
23	0.3	Low
24	17.4	High
25	26.7	High
26	29.3	High
27	26.6	High
28	0.0	Low
30	0.5	Low
31	10.1	High
32	0.3	Low

レポートポイントテーブルを用いたランキングとピックアップ

Evaluation → **Add Report Point Table...**をクリックする。

↓

Evaluation Explorerに**Report Point Table**フォルダとファイルが追加され、**Work area**には、全測定サイクル分のデータが表示される。


Biacore T100 Evaluation Software [C:¥Bia Users¥Templates¥demodata¥KineticsAffinity - small molecules.blr] - [Report Point Table]
File View Evaluation Tools Window Help
Sensorgram Plot Concentration Analysis Kinetics / Affinity Affinity in Solution Thermodynamics
Evaluation Explorer
Edit Remove
Sensorgram
All sensorgrams
Plot
Baseline: Sample
Binding level
Binding stability
Binding to reference
Carry-over
Controls, binding
Controls, stability
Report Point Table
Report Point Table
Solvent Correction
Solvent Correction
Cycle Fc Time [s] Window [s] AbsResp [RU] SD Slope [RU/s] LRSD Baseline RelResp [RU] Report Point Cyc

各カラム上部のフィルター ▼ を使用し、必要データの抽出を行う。

Fc	リファレンス差し引きデータ
Report Point	binding（結合レスポンスのレポートポイント名）
Assay Step	Sample（緩衝液添加サイクル等を除く）

抽出終了後、RelResp [RU] を 2 回クリックする。

↓

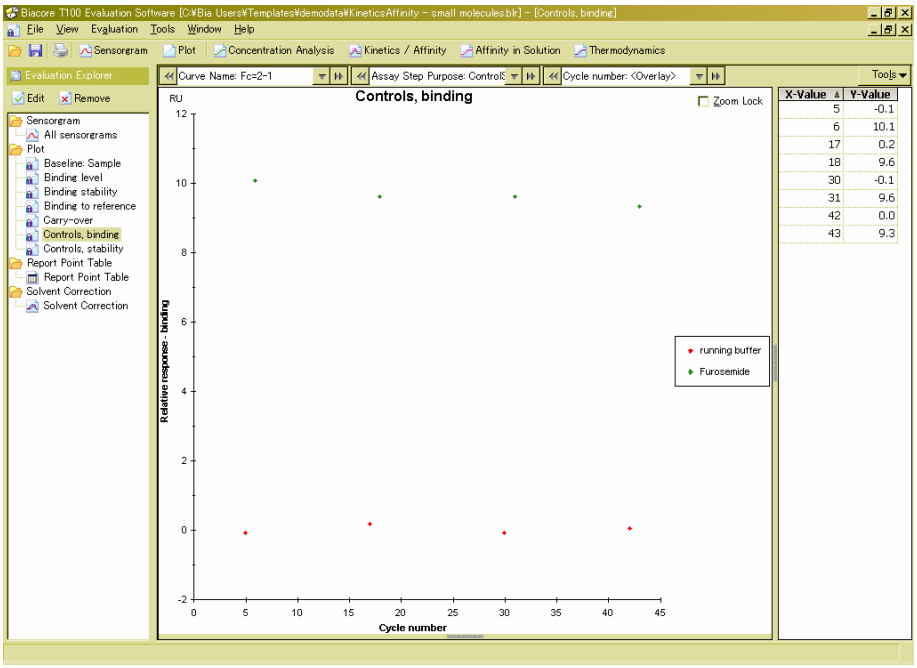
Cycle	Time [s]	Window [s]	AbsResp [RU]	SD	Slope [RU/s]	LRSD	Baseline	RelResp [RU]	Report Point	CycleType
									Binding	
26	110.7	5	716.3	0.09479	-0.003208	0.09563	No	29.3	binding	LMW kinetics
25	110.8	5	713.8	0.118	0.00798	0.1186	No	26.7	binding	LMW kinetics
27	110.8	5	713.4	0.1145	0.01468	0.1136	No	26.6	binding	LMW kinetics
24	110.8	5	704.6	0.1789	0.09433	0.1122	No	17.4	binding	LMW kinetics
14	110.8	5	700.2	0.1422	-0.02779	0.1375	No	11.3	binding	LMW kinetics
13	110.9	5	697.5	0.1242	-0.02631	0.1191	No	8.2	binding	LMW kinetics
15	110.7	5	697.1	0.1386	-0.03882	0.1273	No	8.2	binding	LMW kinetics
22	110.9	5	694.6	0.1745	0.08511	0.1214	No	7.0	binding	LMW kinetics
39	110.8	5	690.4	0.2047	0.05007	0.1926	No	6.3	binding	LMW kinetics
38	110.8	5	688.8	0.1283	-0.01903	0.1264	No	4.7	binding	LMW kinetics
40	110.8	5	688.3	0.1308	-0.02077	0.1284	No	4.4	binding	LMW kinetics
12	110.8	5	693.2	0.1197	0.01141	0.1197	No	3.8	binding	LMW kinetics
37	110.8	5	686.5	0.11	-0.006436	0.1107	No	2.2	binding	LMW kinetics
21	110.7	5	689.5	0.1408	0.0451	0.1251	No	1.7	binding	LMW kinetics
10	110.7	5	691.2	0.1412	-0.01102	0.1416	No	1.4	binding	LMW kinetics
20	110.7	5	688.6	0.1024	0.004604	0.1033	No	0.8	binding	LMW kinetics

結合レスポンスが高い順に並ぶ。

補足 5-31. クオリティーチェック

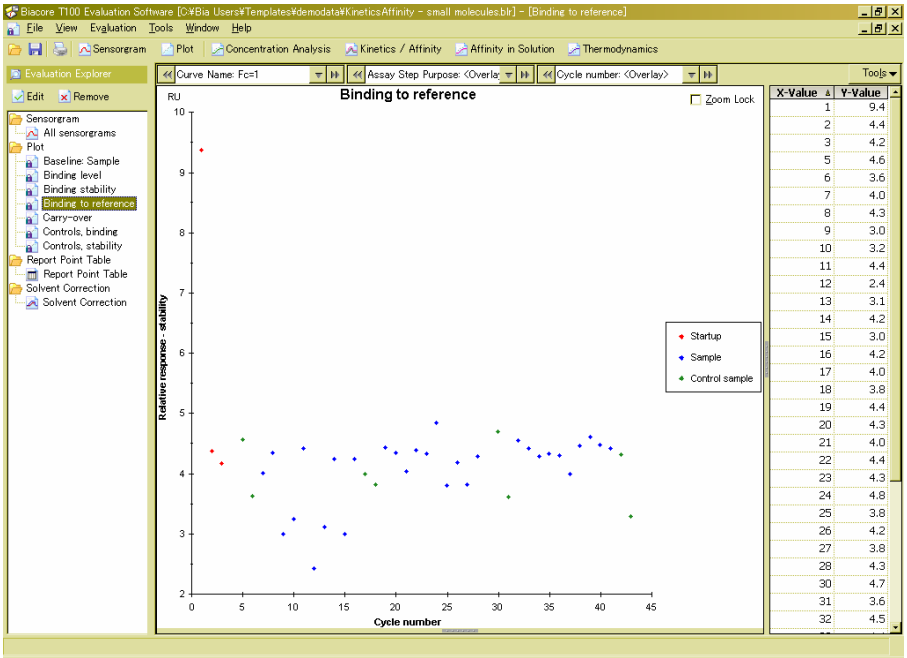
コントロールサンプルのレスポンスチェック

リガンドの安定性評価が目的で、定期的にコントロールサンプルを添加している場合、Evaluation Explorer 中の Plot フォルダに存在する Controls: binding データでチェックする。



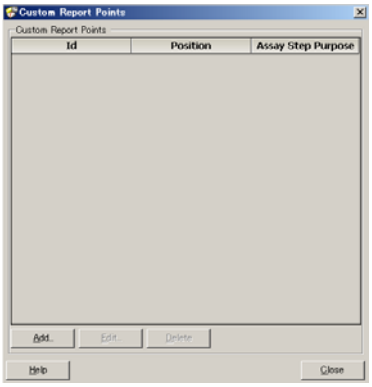
リファレンスセルへの非特異的吸着量チェック

Evaluation Explorer の Plot フォルダの Binding to reference データでチェックする。



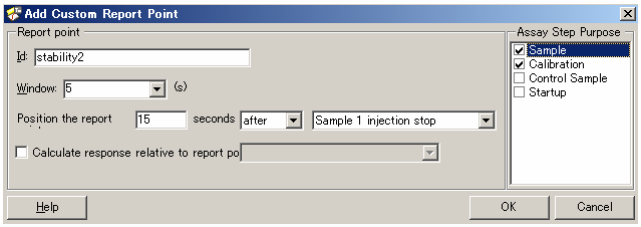
補足 5-32. レポートポイントの追加

Tools → **Custom Report Point...**をクリックする。



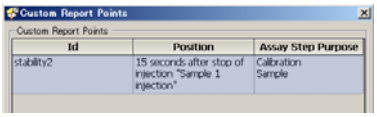
Add...をクリックする。

↓



名称、追加する位置、どのステップのレスポンスを記録するか設定し、**OK** をクリックする。

↓



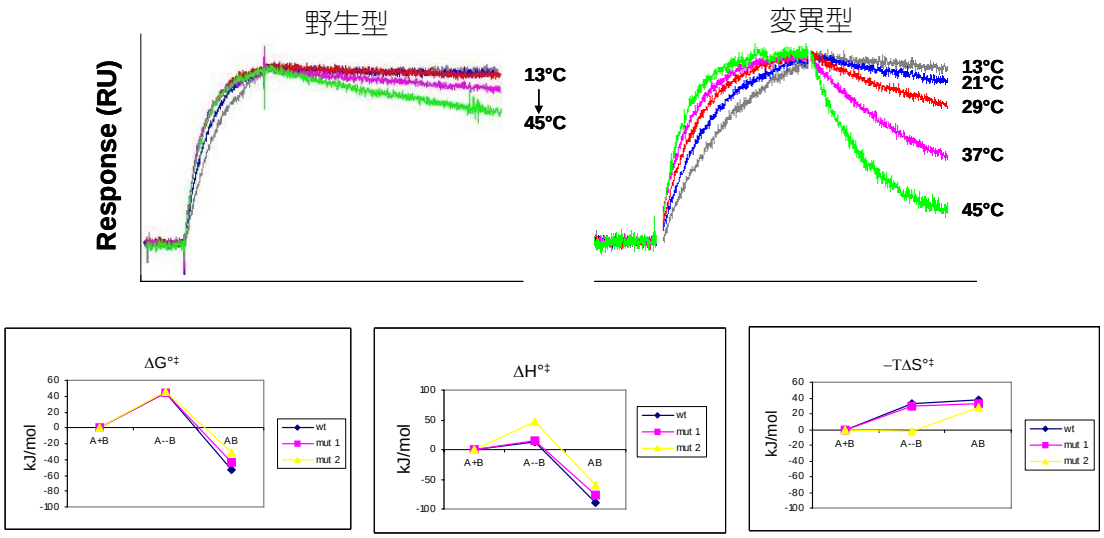
初期画面に、追加したレポートポイントが表示される。

5-4. 熱力学的パラメータの算出

熱力学的解析

熱力学的パラメータは、分子同士の相互作用メカニズム解析に対して重要な情報を提供する。Biacore では、熱力学的パラメータは、複数の温度条件で速度論的相互作用解析を実施することで算出できる。平衡状態における熱力学的パラメータ（ΔG°、ΔH°、ΔS°）のみならず、遷移状態における熱力学的パラメータ（$\Delta G^{\circ\ddagger}$、$\Delta H^{\circ\ddagger}$、$\Delta S^{\circ\ddagger}$）も算出することが可能である。平衡状態におけるパラメータからは“その分子同士がその強さで結合する理由”、遷移状態におけるパラメータからは“その分子同士がその速度で結合、解離する理由”を議論することができる。

例として、ある抗原と抗体（野生型と 2 種類の変異型）の相互作用を紹介する。
通常の速度論的解析では、ある温度で相互作用測定を実施し、算出された反応速度定数の比較から野生型と変異型の結合および解離速度の違いを知ることができる。さらに、熱力学的解析の結果からは、下図に示したように、変異型 2 の$\Delta H^{\circ\ddagger}$と$\Delta S^{\circ\ddagger}$が野生型および変異型 1 のそれらとは大きく異なっていることがわかる。すなわち、変異型 2 は野生型および変異型 1 とは異なった様式で相互作用していることが示唆される。



熱力学的パラメータの解析手順

数段階（4 段階以上）温度において同一分子間の相互作用測定を行い、解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を算出する。
平衡状態、遷移状態における熱力学的パラメータ算出には、それぞれ次式を応用している。各温度において算出した解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を代入する。

平衡状態における熱力学的パラメータ算出

van't Hoff 式を応用する。各温度における解離定数（K_D）を代入し、各種パラメータを算出する。線形解析と非線形解析により算出可能。非線形解析が主流である。

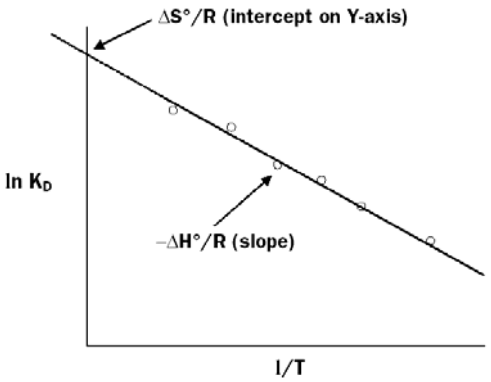
線形解析

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_D$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$\ln K_D = \Delta H^\circ / RT - \Delta S^\circ / R$$

ΔG°	自由エネルギー変化（kJ/mol）
R	気体定数
T	絶対温度（K）
K_D	解離定数（M）
ΔH°	エンタルピー変化（kJ/mol）
ΔS°	エントロピー変化（J/K・mol）



非線形解析

$$RT \ln K_D = \Delta H^\circ_{T_0} - T\Delta S^\circ_{T_0} + \Delta C^\circ_p (T - T_0) - T\Delta C^\circ_p \ln(T / T_0)$$

ΔC_p	熱容量変化（kJ/K・mol）
T_0	基準温度（標準状態では 25℃）

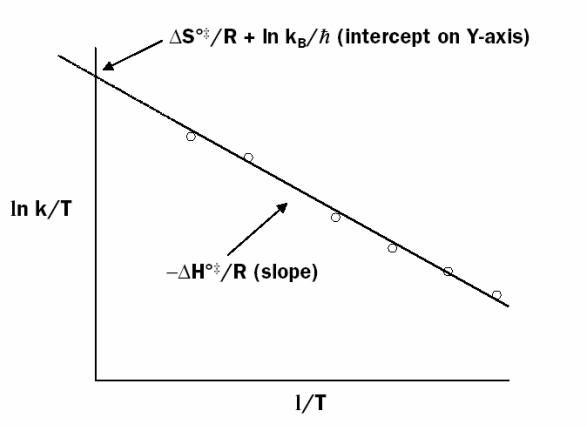
遷移状態における熱力学的パラメータ算出

Eyring 式を応用する。各温度における反応速度定数（k_a, k_d）を代入し、各種パラメータを算出する。

$$k = (k_B T / h) \exp(\Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT)$$

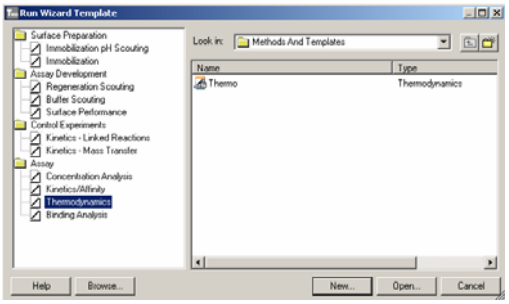
$$\ln k / T = \Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT + \ln kB / h$$

k	各反応速度定数
k_B	ボルツマン定数
h	プランク定数
$\Delta S^{\circ\ddagger}$	エントロピー変化（J/K・mol）
R	気体定数
$\Delta H^{\circ\ddagger}$	エンタルピー変化（kJ/mol）
T	絶対温度（K）
$\Delta G^{\circ\ddagger}$	自由エネルギー変化（kJ/mol）



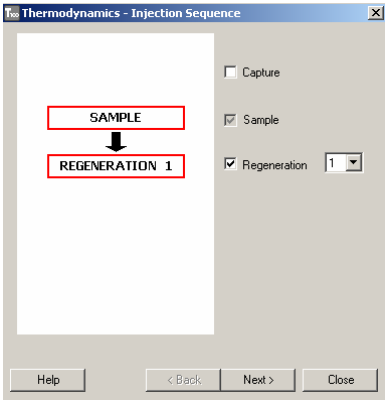
5-4-1. プログラムの実行

Toolbar の **Run Wizard** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Thermodynamics** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

Sample

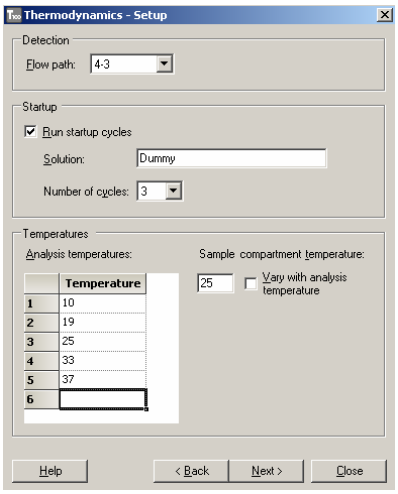
アナライトの添加

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回もしくは 2 回の選択をする。

Next >をクリックする。

↓



Detection

Flow path　測定を行うフローセルを設定する。
基本的にリファレンスの差し引き機能を利用するのが望ましい。なお、キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 の選択のみとなる。

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をサンプル（アナライト）測定前にダミーランとして実施する。ランニング緩衝液を用い、3回以上実施することを推奨する。

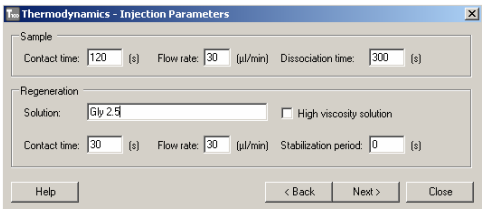
Temperatures

Analysis temperatures
検出部位の温度を設定する。25℃を真ん中に、5 点以上とることを推奨する。

Sample compartment temperatures
サンプルコンパートメントの温度を入力する。

Next >をクリックする。

↓



Sample

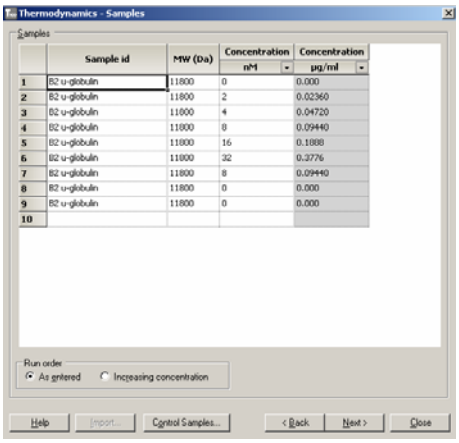
Contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Regeneration

Solution	再生溶液の名称	
High viscosity solution		
	粘性の高い溶液の場合は選択する	
Contact time	再生溶液の添加時間	30 s
Flow rate	流速	30 ul/min
Stabilization period	添加後のベースライン安定化時間	0 s

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



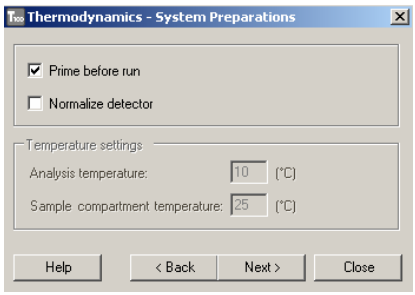
Sample id	アナライトの名称
MW (Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度　nM　”と“重量濃度 ug/ml”を換算する。

補足 5-33. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

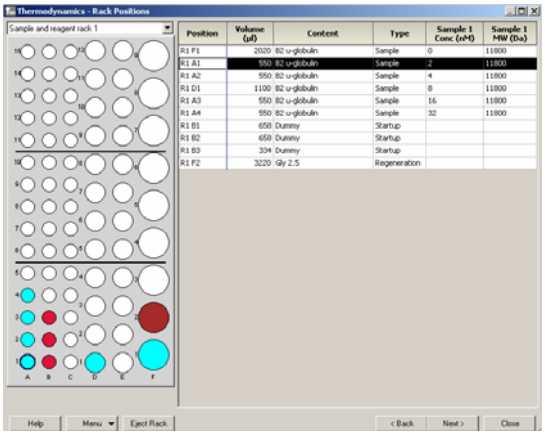
入力後、**Next >**をクリックする。

↓



測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

↓



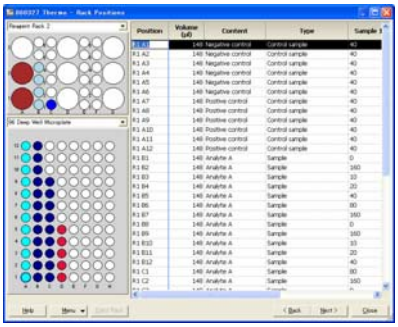
右側の表でサンプルの位置と容量(ul)を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-34. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

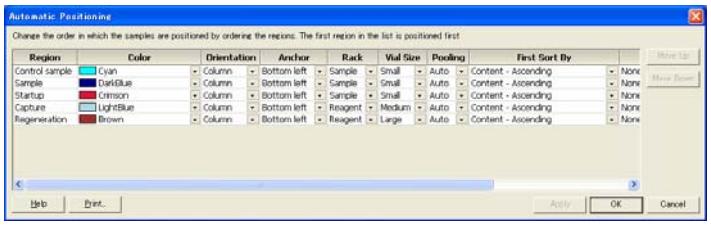
補足 5-35. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

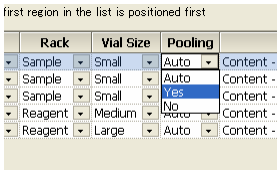
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

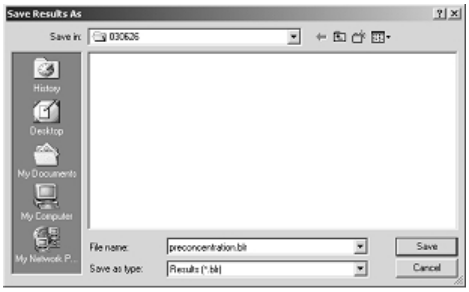
↓

基本的な共通注意事項が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

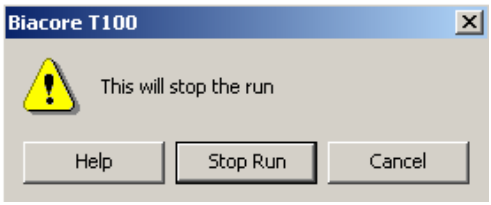
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動する。

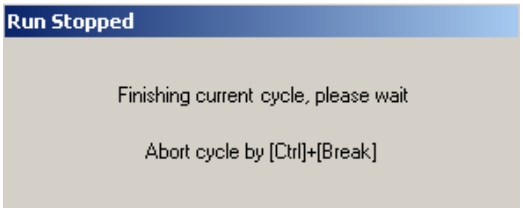
補足 5-36. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

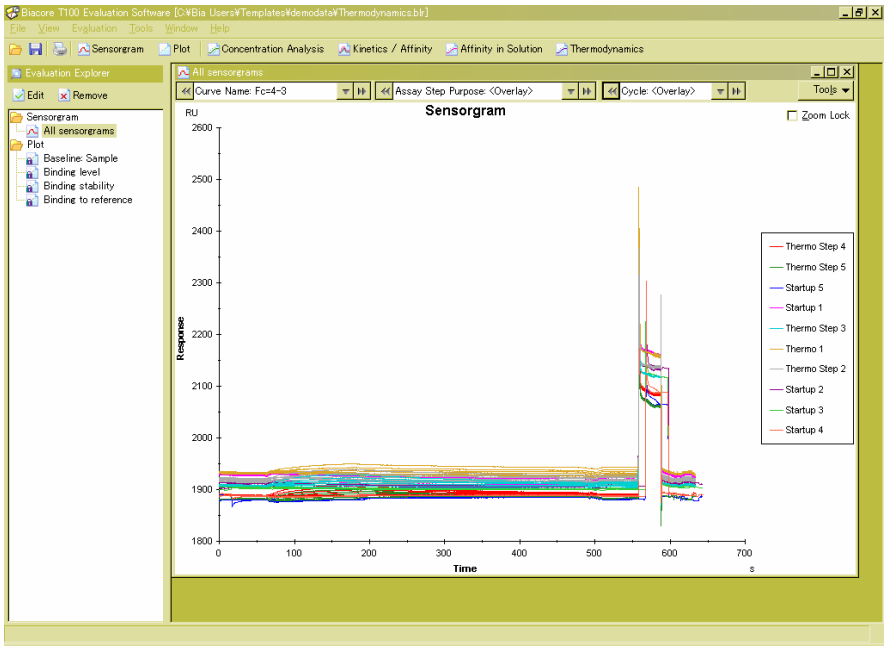
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

5-4-2. データ解析

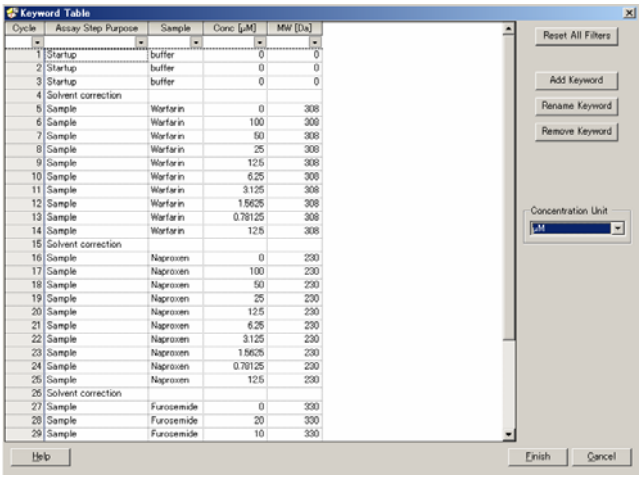
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



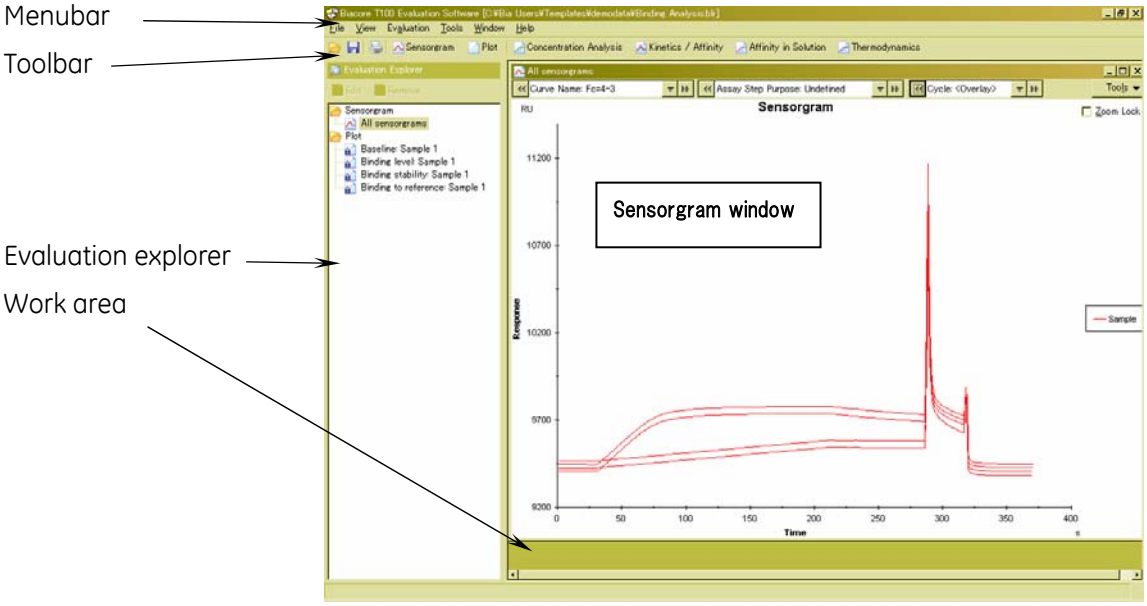
補足 5-37. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



補足 5-38. 画面の説明

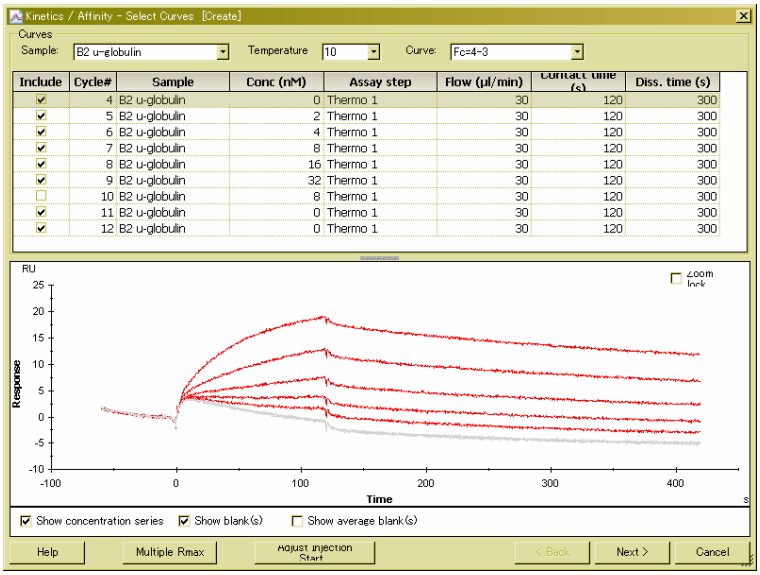


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

各温度における解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a,k_d）を算出する。
詳細は 5-1. 反応速度定数・解離定数の算出を参照のこと。

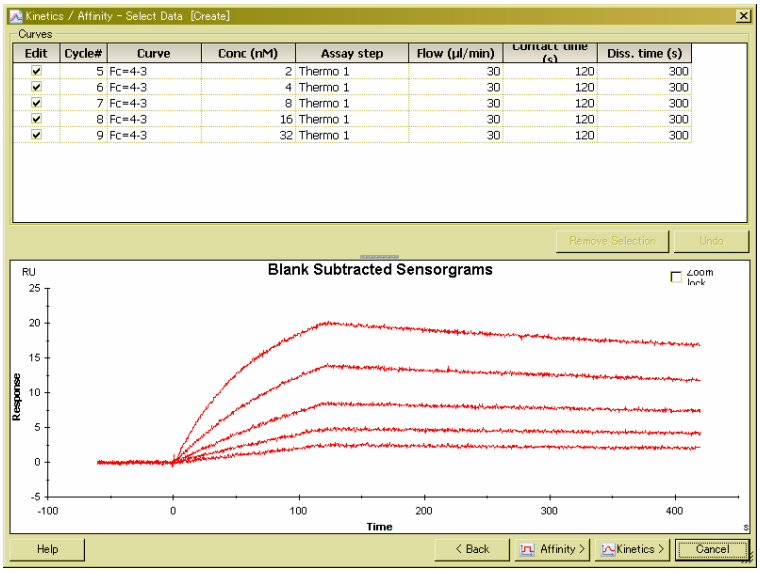
Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

↓



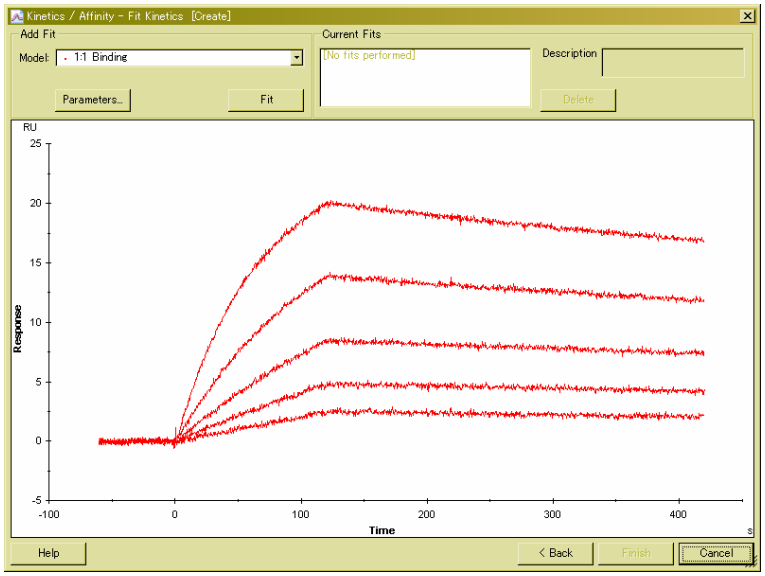
同一温度、同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示される。
Next >をクリックする。

↓



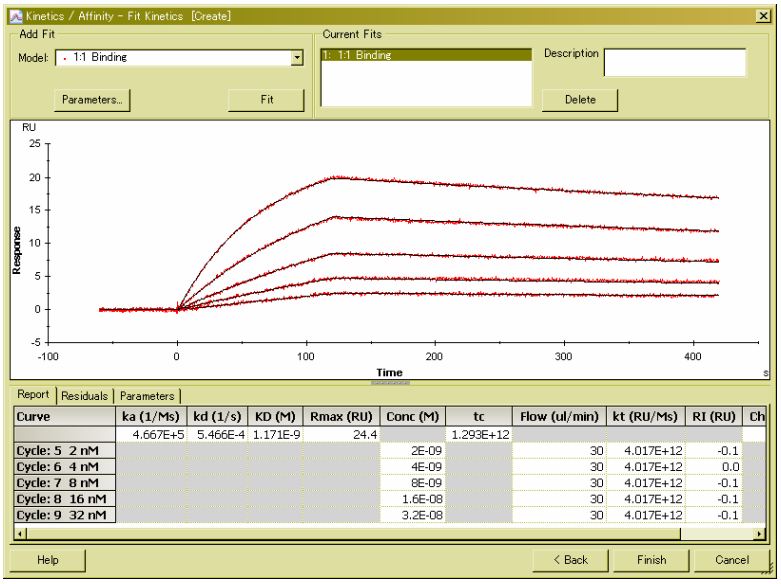
濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。
Kinetics >をクリックする。

↓



Model:に、**1:1 Binding** を選択する。**Fit** をクリックする。

↓



Finish をクリックする。

↓

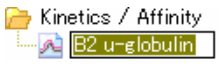
上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。ファイル名は自動的にサンプル名が採用される。

この実験では、測定温度を変化させて、同一サンプルで同様の実験を行うため、どの温度についての解析結果も同一ファイル名（サンプル名）で保存される。混乱を避けるため、この時点でファイル名の変更を行うことを推奨。補足 5-39 を参照。

補足 5-39. ファイル名の変更

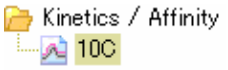
Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックする。

↓



上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力する。

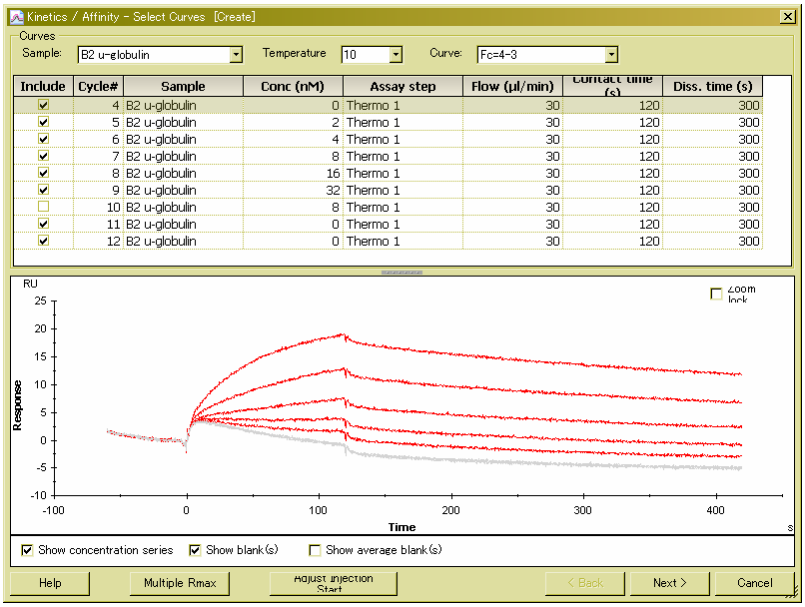
↓



同様に、別の温度の測定データについても解析する。

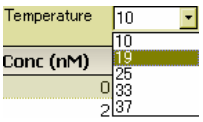
Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

↓


Kinetics / Affinity - Select Curves [Create]
Curves
Sample: B2 u-globulin
Temperature 10
Curve: Fc=4-3
Include Cycle# Sample Conc (nM) Assay step Flow (µl/min) Contact time (s) Diss. time (s)
4 B2 u-globulin 0 Thermo 1 30 120 300
5 B2 u-globulin 2 Thermo 1 30 120 300
6 B2 u-globulin 4 Thermo 1 30 120 300
7 B2 u-globulin 8 Thermo 1 30 120 300
8 B2 u-globulin 16 Thermo 1 30 120 300
9 B2 u-globulin 32 Thermo 1 30 120 300
10 B2 u-globulin 8 Thermo 1 30 120 300
11 B2 u-globulin 0 Thermo 1 30 120 300
12 B2 u-globulin 0 Thermo 1 30 120 300
RU
Response
Time
Zoom lock
Show concentration series
Show blank(s)
Show average blank(s)
Help
Multiple Rmax
Adjust injection Start
< Back
Next >
Cancel

Temperature 右側の▼をクリックする。

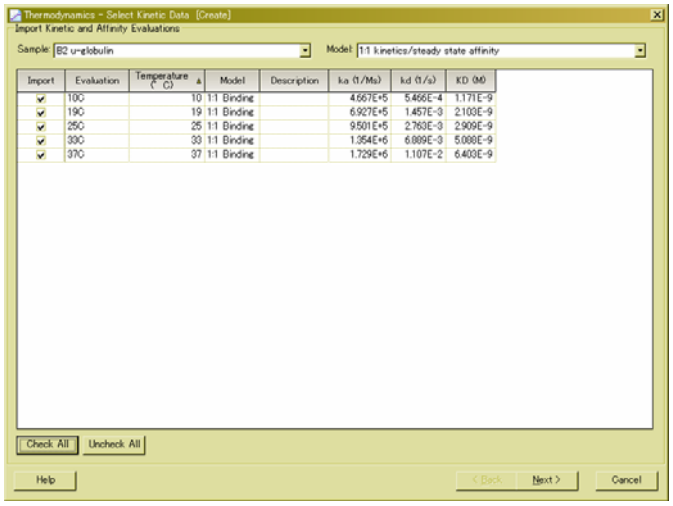
↓



温度を変更し、反応速度定数（k_a,k_d）の算出を行う。すべての温度について解析終了後、**Toolbar** の Thermodynamics をクリックする。自動的に全解析結果がテーブルに表示される。

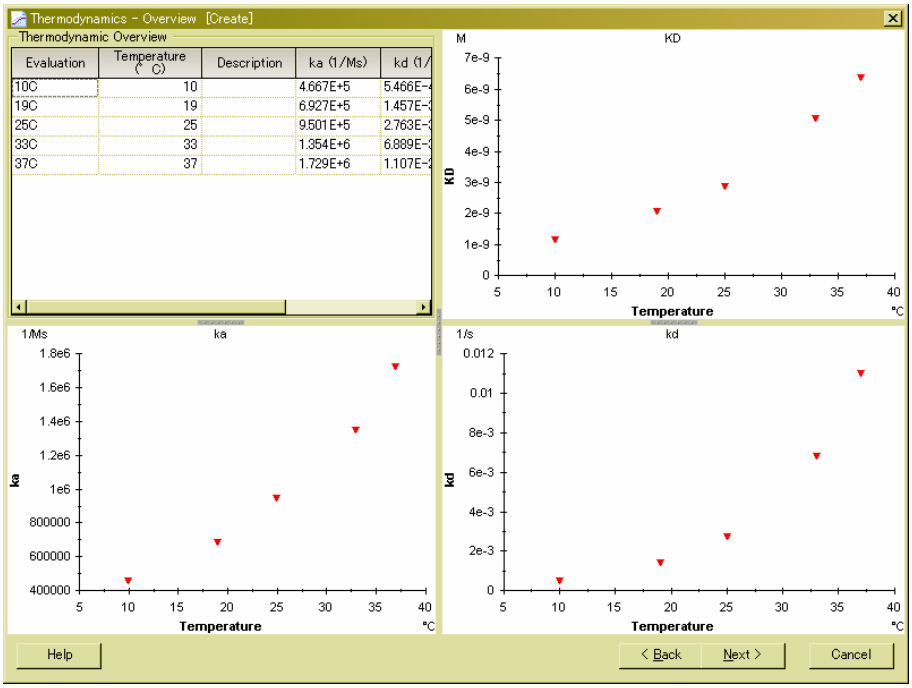
Import にチェックをチェックし、Thermodynamics に利用するデータを選択する。

Check All をクリックするすると、全データが選択される。



Next >をクリックする。

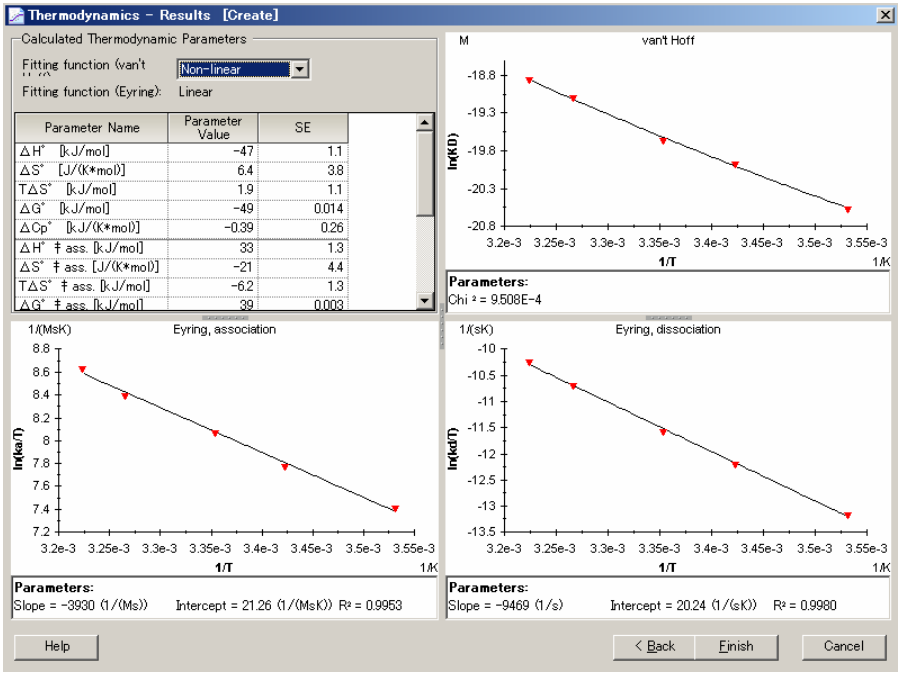
↓



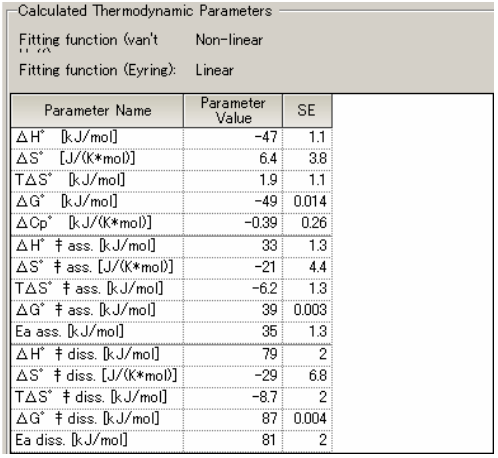
温度に対する解離定数、各反応速度定数のプロットが表示される。

Next >をクリックする。

↓

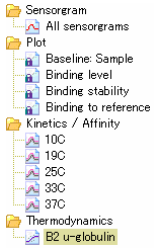


▼から、線形解析または非線形解析を選択する。選択した解析手法の結果が表示される。すべての熱力学的パラメータは、左上のテーブルに表示される。



Finish をクリックする。

上記解析結果は、**Evaluation Explorer** 中の Thermodynamics フォルダに追加される。ファイル名は自動的にサンプル名が採用される。



5-5. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

低分子化合物の溶解性の問題で有機溶媒を利用する場合には、一般的なタンパク質-タンパク質相互作用測定と異なり、ランニング緩衝液およびサンプル調製に注意が必要となる。また、測定結果を評価するにあたり溶媒効果の補正が必要となる。

アナライトの調製

アナライト溶液のDMSOの終濃度をランニング緩衝液と合わせる。化合物濃度は結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよるが数十nM～数uMで調製する。反応速度定数の算出が目的の場合、K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製する。

ランニング緩衝液

PBS や HEPES 緩衝液が広く利用される。HEPES は、ヒト血清アルブミンへの結合が見られるので注意する。

有機溶媒を利用する場合には、DMSO 含有緩衝液を使用することが多い。DMSO 濃度は 5%程度以下を推奨する。DMSO濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定する。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は 10%までである。

非特異的吸着を抑える目的で、終濃度0.05%程度の界面活性剤（Surfactant P20など）を添加することもある。

補足 5-40. ランニング緩衝液調製の注意事項

弊社販売の PBS 10X バッファー（1 x 1000 ml, BR-1006-72）は pH 調製済み。

0.1M phosphate buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈後、DMSO を加える。

0.01 M phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH7.4

ランニング緩衝液は用事調製する。

DMSO を扱う際には、耐性材質の容器を使用する。（プラスチック容器は使用不可）

DMSOを含む緩衝液をろ過する際には、テフロン製またはナイロン製のフィルター（0.22um）を用いる。酢酸セルロース製のものは避ける。DMSO 溶液中の混合物も測定に影響を及ぼす場合があるのでグレードの高いもの(UV spectrometry 用等)を使用する。なお、DMSO 混合による pH 変動は大きいため、DMSO 混合後の pH を考慮する。

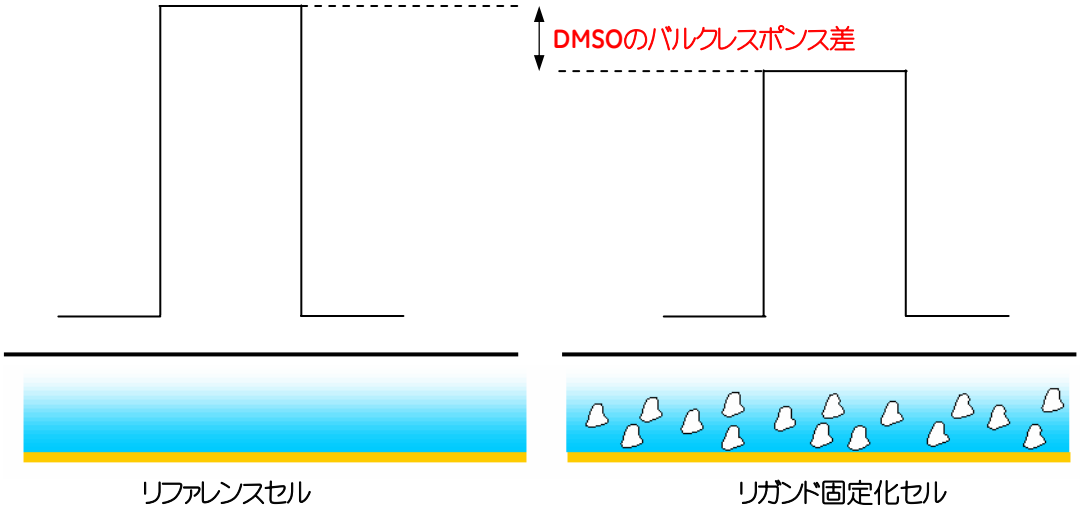
きれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めておく。装置のボトルポジションにセットする際は必ず付属のスクリューキャップを使用する。

溶媒補正

SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率(RI)の変化を反映している。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒（バルク）効果レスポンスが含まれる。

溶媒効果が小さい（100 RU 以下）実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できる。

しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなる。



ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いは約 1,500 RU のバルクレスポンスに相当する。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性がある。

このように、溶媒効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできない。実際、このバルクレスポンスの差は小さい（通常 10 RU 以下）が、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクの差を補正する必要がある。

溶媒補正は以下の 3 つの要因が重複した際必要となる。

- 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい(100 RU 以下)場合
- リガンドを高密度（10,000 RU 以上）に固定化した場合
- サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく（30,000 RU 以上）、サンプル間で値が異なる場合（DMSO 濃度の“誤差”も含めて）

補足 5-41. 溶媒補正の方法

溶媒補正の手順

Biacore T100 Evaluation Software では以下の補正を自動で行う。

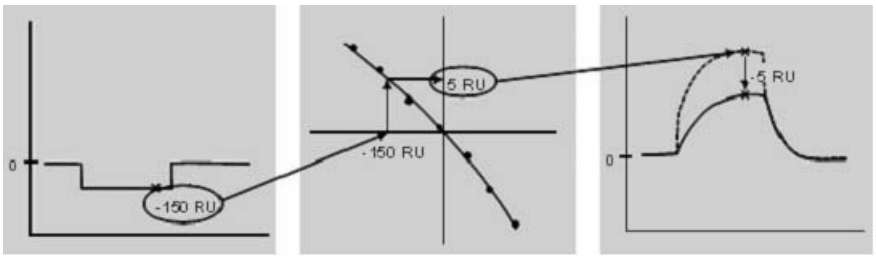
測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1 %程度）を、リガンド固定化セル及びリファレンスセルに添加し、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を記録する。

リファレンスセルのレスポンスを x 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成する。

低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正用曲線に代入して、補正値を算出する（図②）。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正値を差し引く（図③）。

①　②　③



溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載する。

すべての DMSO 溶液は用事調製する。

①1x PBS（no DMSO）を調製する。

②溶媒補正用曲線 4 %、6 % DMSO ストック溶液を調製する。

4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9600 ul
	100 % DMSO	400 ul
		10000 ul
6 % DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9400 ul
	100 % DMSO	600 ul
		10000 ul

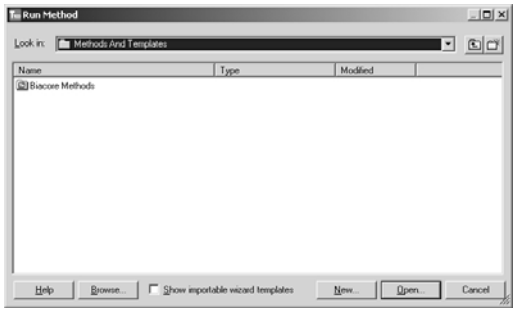
③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4 %～6 %の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する。以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールである。

4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100		
	700	700	700	700	700	700	700	700	(ul)

5-5-1. プログラムの実行

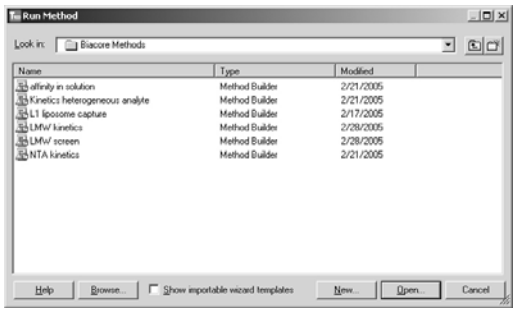
Toolbar の **Run Method** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。

↓



Biacore Methods を選択する。

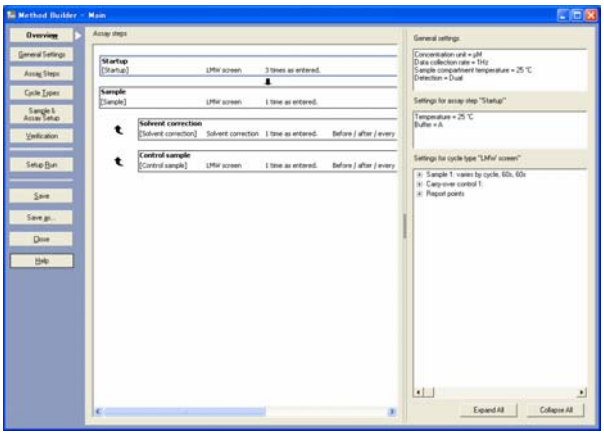
↓



LMW screen または **LMW kinetics** を選択して、**Open...**をクリックする。
ここでは、スクリーニング用プログラムの **LMW screen** について記載する。反応速度定数・解離定数算出用プログラムの **LMW kinetics** については、補足 5-47 を参照。

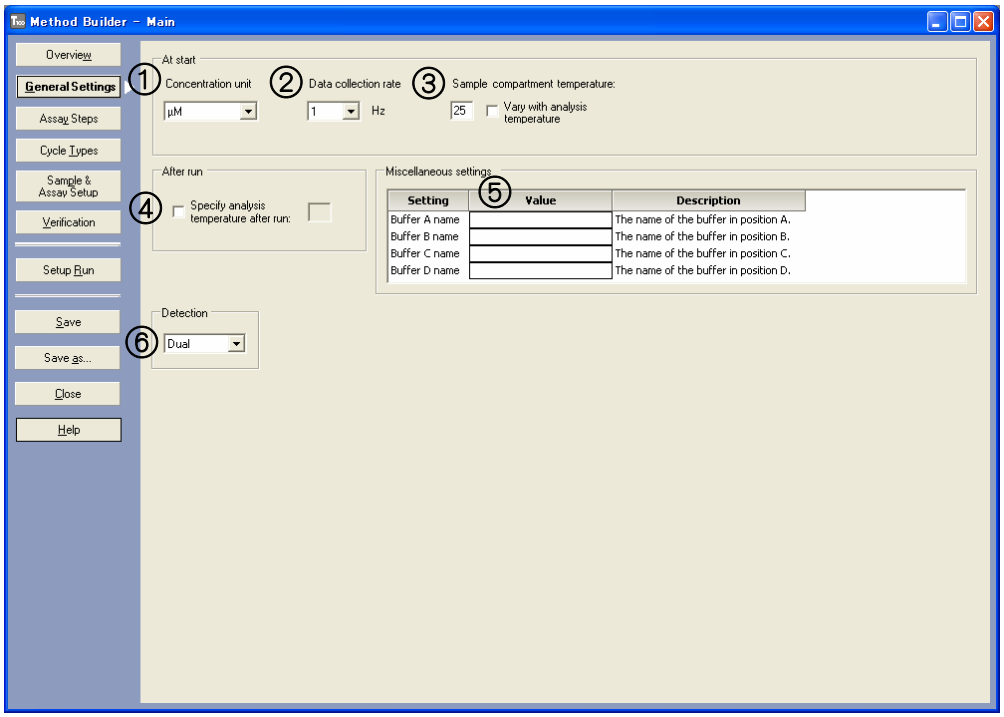
↓

Method Builder の **Main** ダイアログが表示される。**Overview** 画面にはメソッド全体の設定項目が表示される。以下に変更項目について記載する。詳細は 6 章を参照。



General settings をクリックする。

↓



① **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択。

② **Data Collection rate**

1Hz を選択。

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4℃～45℃）を設定。通常は、25℃。

④ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

⑤ **Miscellaneous settings**

使用するランニング緩衝液名を入力。

⑥ **Detection**

検出モードを以下の 3 つ（Single,Dual,Multi）から選択する。

Single　1、2、3、4

Dual　1,2、3,4、2-1、4-3

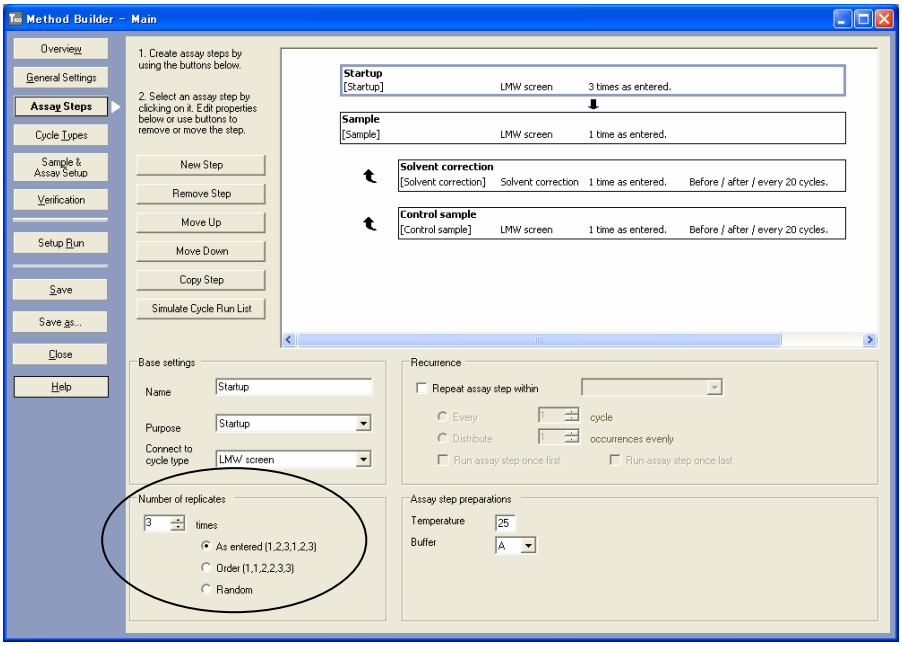
Multi　1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

設定後、**Assay Steps** をクリックする。

↓

測定全体のアウトラインを確認する。

Startup を選択する。

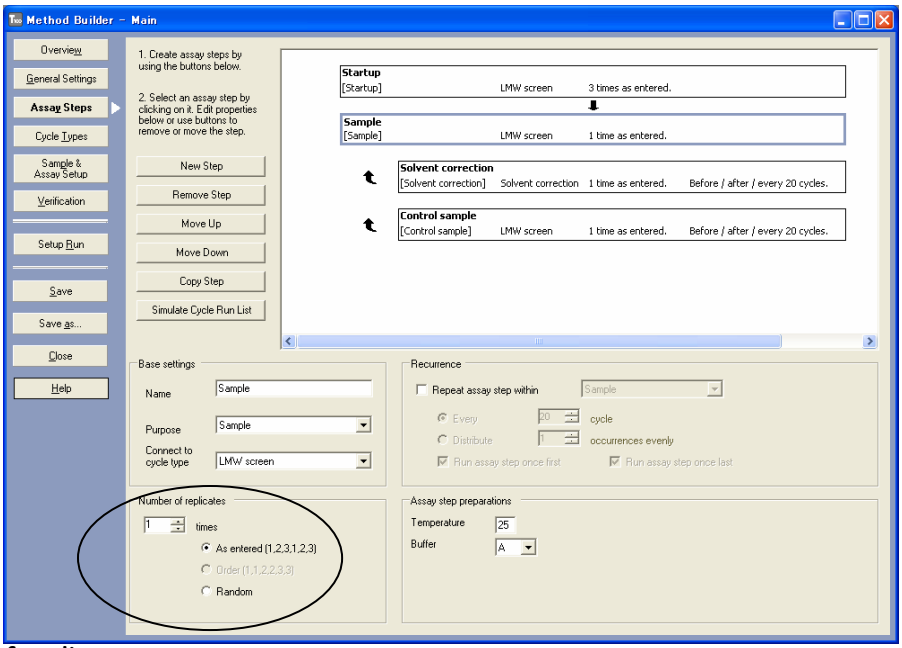

Method Builder – Main
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
Save
Save as...
Close
Help
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] LMW screen 3 times as entered.
Sample [Sample] LMW screen 1 time as entered.
Solvent correction [Solvent correction] Solvent correction 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Control sample [Control sample] LMW screen 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Base settings
Name Startup
Purpose Startup
Connect to cycle type LMW screen
Recurrence
Repeat assay step within
Every cycle
Distribute occurrences evenly
Run assay step once first
Run assay step once last
Number of replicates
3 times
As entered (1,2,3,1,2,3)
Order (1,1,2,2,3,3)
Random
Assay step preparations
Temperature 25
Buffer A

Number of replicates

Times　　スタートアップの測定回数を指定する。3 回以上を推奨。

↓

Samples をクリックする。

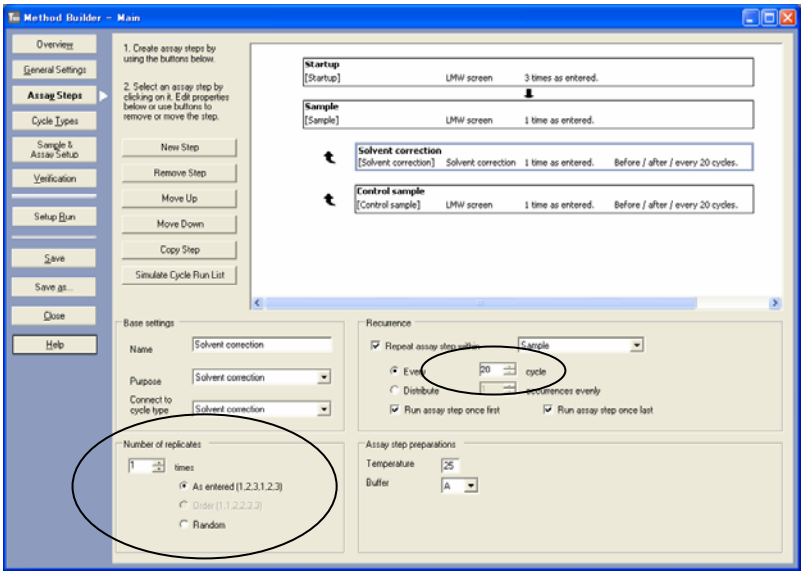

Method Builder – Main
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
Save
Save as...
Close
Help
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] LMW screen 3 times as entered.
Sample [Sample] LMW screen 1 time as entered.
Solvent correction [Solvent correction] Solvent correction 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Control sample [Control sample] LMW screen 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Base settings
Name Sample
Purpose Sample
Connect to cycle type LMW screen
Recurrence
Repeat assay step within Sample
Every 20 cycle
Distribute 1 occurrences evenly
Run assay step once first
Run assay step once last
Number of replicates
1 times
As entered (1,2,3,1,2,3)
Order (1,1,2,2,3,3)
Random
Assay step preparations
Temperature 25
Buffer A

Number of replicates

Times　　繰り返し測定回数を選択する。別途、測定順番を選択する。

↓

Solvent correction をクリックする。


Method Builder - Main
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
Save
Save as...
Close
Help
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] LMW screen 3 times as entered.
Sample [Sample] LMW screen 1 time as entered.
Solvent correction [Solvent correction] Solvent correction 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Control sample [Control sample] LMW screen 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Base settings
Name Solvent correction
Purpose Solvent correction
Connect to cycle type Solvent correction
Recurrence
Repeat assay step within Sample
Every 20 cycle
Distribute occurrences evenly
Run assay step once first
Run assay step once last
Number of replicates
1 times
As entered (1,2,3,1,2,3)
Order (1,1,2,2,3,3)
Random
Assay step preparations
Temperature 25
Buffer A

Recurrence

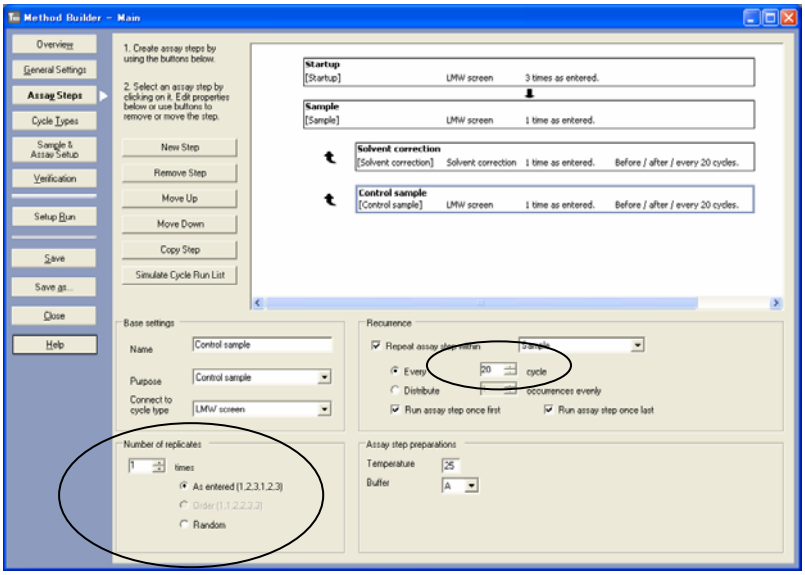
Cycles　溶液補正サイクルを何サイクル毎に行うか選択する。

Number of replicates

Times　繰り返し測定回数を選択する。別途、測定順番を選択する。

↓

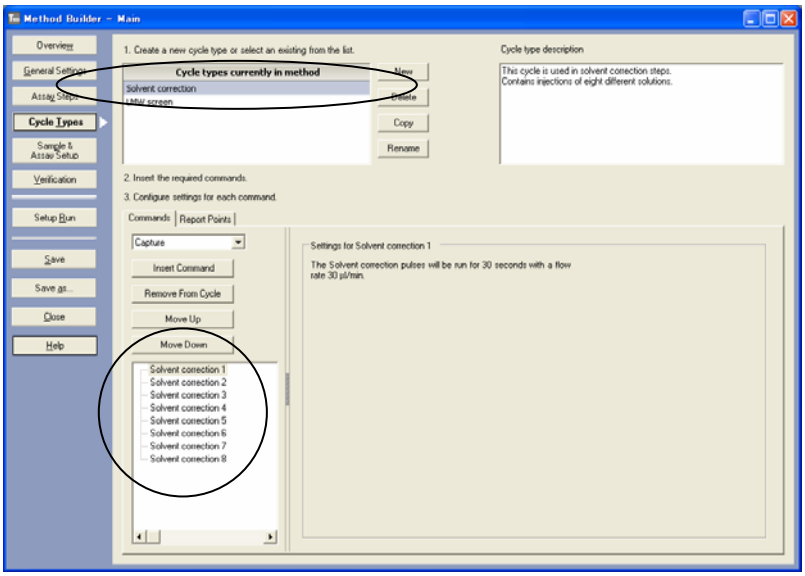
Control sample をクリックする。


Method Builder - Main
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
Save
Save as...
Close
Help
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] LMW screen 3 times as entered.
Sample [Sample] LMW screen 1 time as entered.
Solvent correction [Solvent correction] Solvent correction 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Control sample [Control sample] LMW screen 1 time as entered. Before / after / every 20 cycles.
Base settings
Name Control sample
Purpose Control sample
Connect to cycle type LMW screen
Recurrence
Repeat assay step within Sample
Every 20 cycle
Distribute occurrences evenly
Run assay step once first
Run assay step once last
Number of replicates
1 times
As entered (1,2,3,1,2,3)
Order (1,1,2,2,3,3)
Random
Assay step preparations
Temperature 25
Buffer A

Solvent correction と同様に指定する。

↓

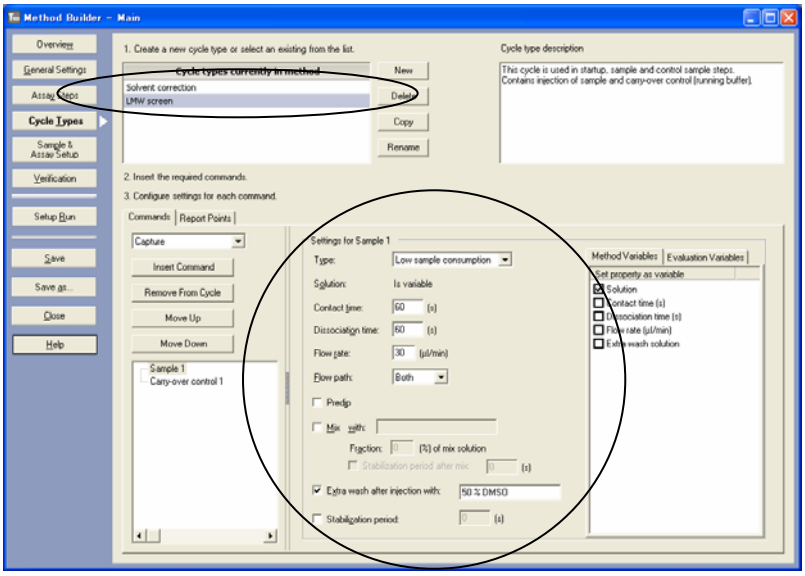
Cycle Types をクリックする。**Solvent correction** をクリックする。



Command タブで補正溶液の測定点を指定する。

↓

LMW screen をクリックする。



Setting for Sample1

Contact time:　アナライト添加時間60s

Dissociation time:　解離時間　60s

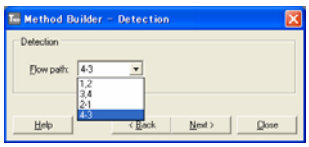
Flow path:　添加方法　Both

Extra wash after injection with:

チェックを入れると、指定溶液（50%　DMSO）でアナライト添加後に流路内の洗浄を行う。

↓

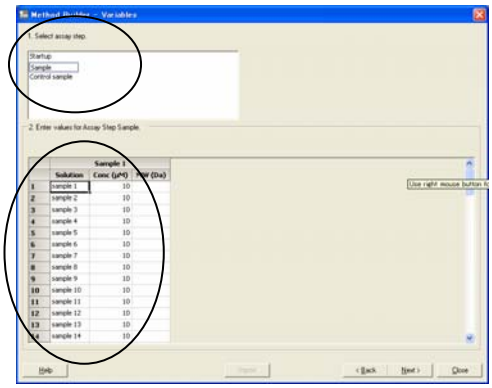
Setup Run をクリックする。



検出するフローセルを選択する。**Next >**をクリックする。

↓

Startup、Sample、Cntrol sample をそれぞれクリックし、テーブルにサンプル情報を入力する。



Sample1

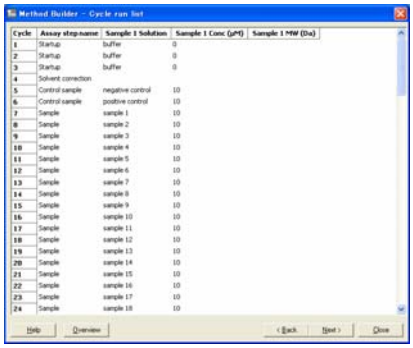
Solution	アナライトの名称
Conc(uM)	アナライト濃度
MW(Da)	アナライトの分子量

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-42.Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

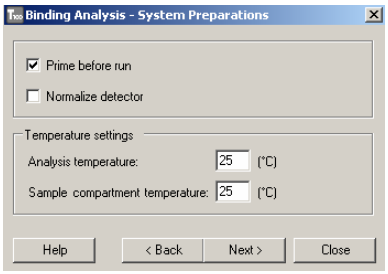
Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓



測定サイクルリストが表示される。**Next >**をクリックする。

↓



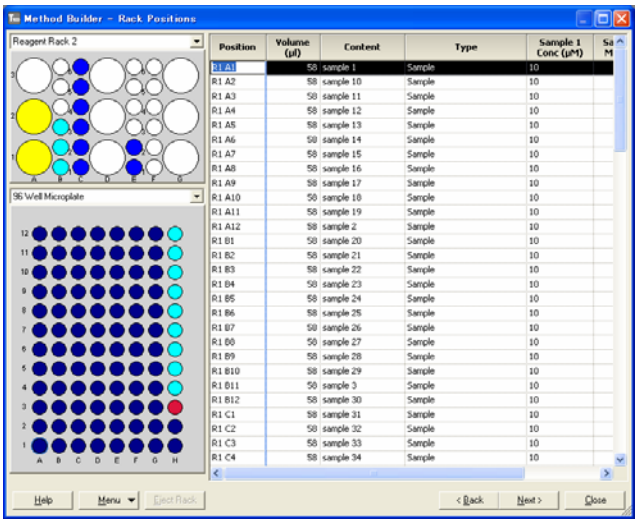
測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Analysis temperature　25 ℃

Sample compartment temperature　25 ℃

Next >をクリックする。

↓



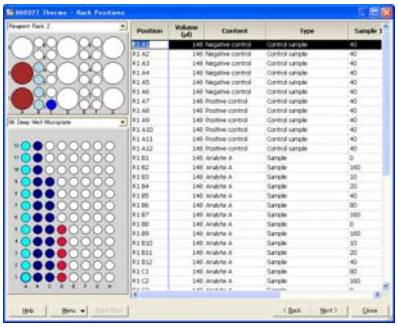
右側の表でサンプルの位置と容量（ul）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-43. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

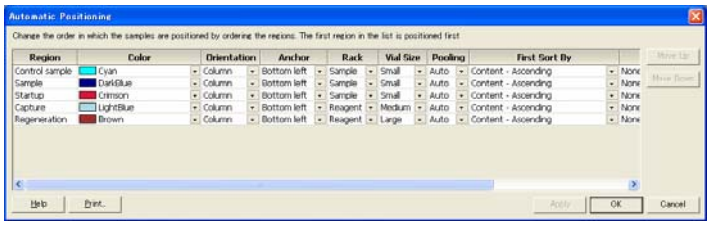
補足 5-44. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

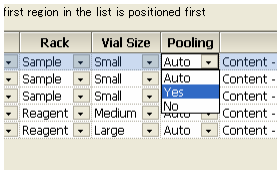
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

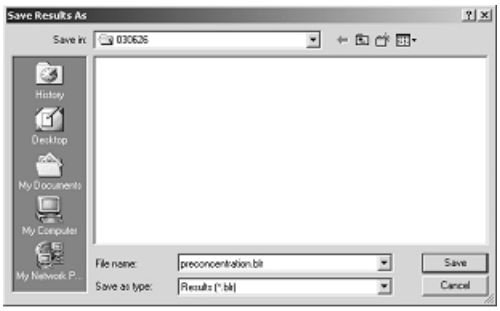
↓

基本的な共通注意事項が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

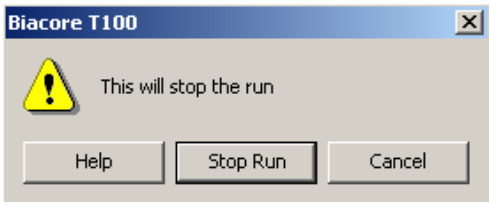
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動する。

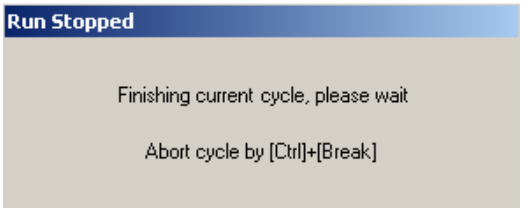
補足 5-45. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

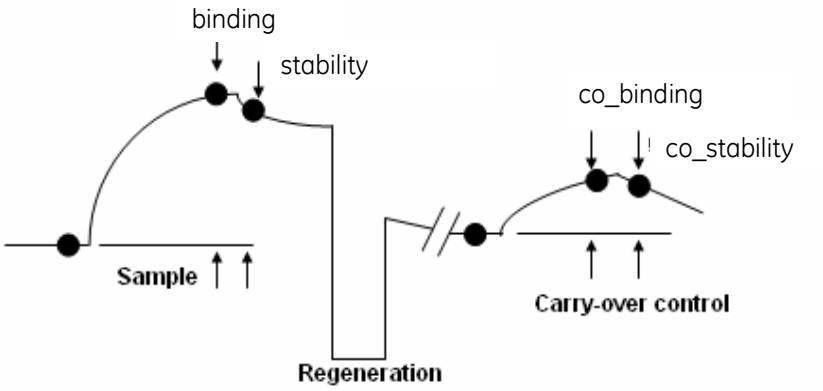
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

補足 5-46. レポートポイントの設定

溶媒（バルク）補正を必要とする実験では、低分子アナライトのバルクレスポンスを測定するために、アナライト添加中（添加終了直前）にレポートポイントを取得する必要がある。自動取得されるレポートポイントの名前はbindingとつている。添加終了直後のレポートポイントはstabilityとして取得される。また、低分子アナライト特有のニードル、流路等へのキャリーオーバーチェックのために、アナライト添加終了後、ランニング緩衝液をアナライトと同等のモードで添加する際に取得されるレポートポイントの名前は、頭に co-がつられている。

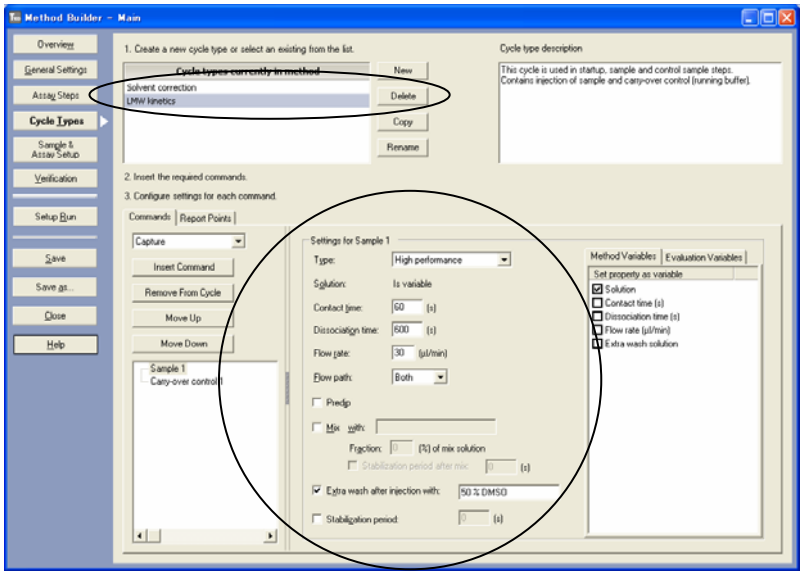


補足 5-47. 低分子化合物アナライトの反応速度定数・解離定数算出プログラム

Tools → Method...の **Biacore Methods** の **LMW kinetics** テンプレートを利用してプログラムを作成する。基本的には、5-5-1. プログラムの実行で説明した、**LMW screen** プログラムと同様に設定を行う。ここでは、スクリーニングのプログラムと異なる点について記載する。

アナライトの添加設定

Cycle Types で **LMW kinetics** をクリックする。

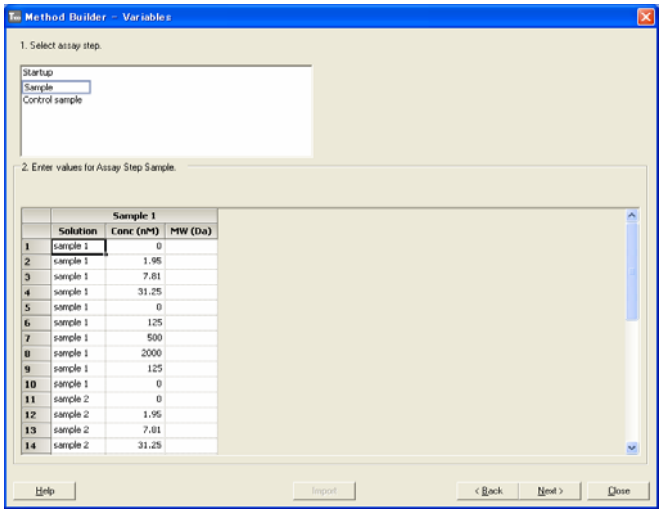


Setting for Sample1 の **Type:**で“High performance”が選択されている。

Evaluation Valiables の **Evaluation purpose:**は、**Kinetics/Affinity** が選択されている。

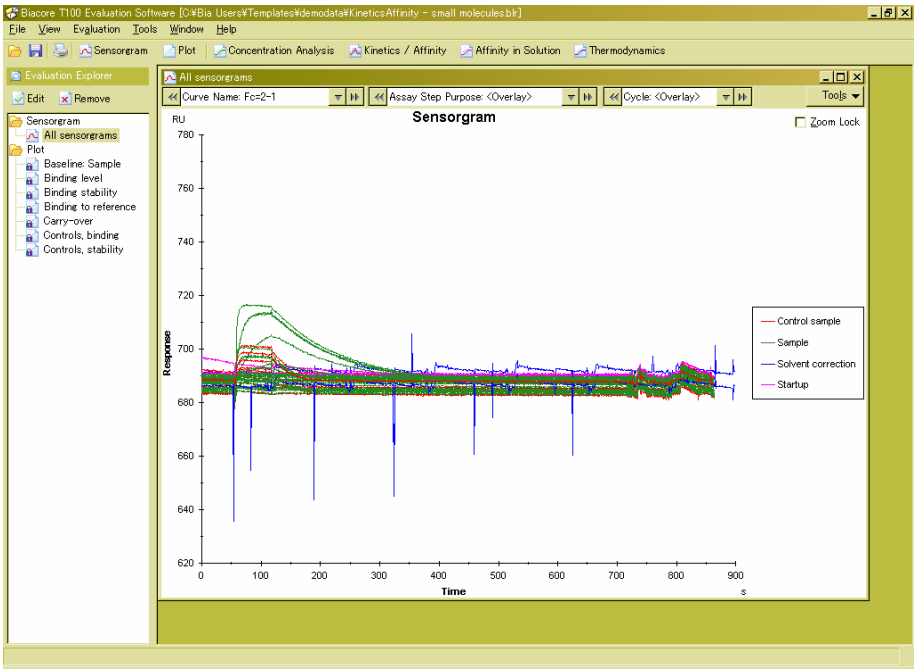
アナライトのサンプル設定

解離定数（K_D）の 1/10～10 倍の濃度範囲が至適アナライト濃度となる。5 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。また、1 濃度については 2 回（n=2）測定を行う。



5-5-2. データ解析

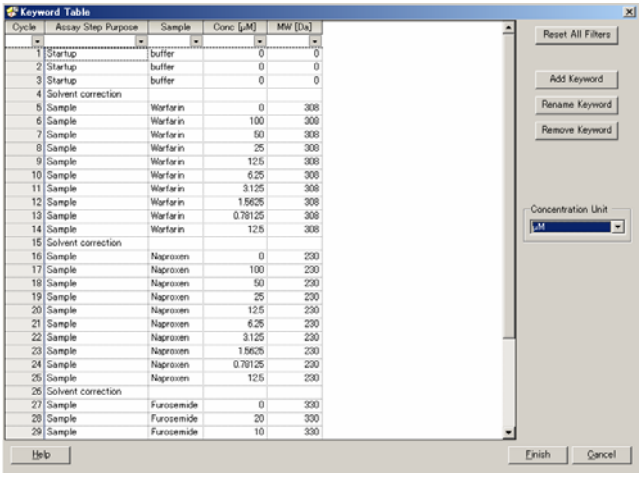
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。(反応速度定数・解離定数算出は、溶媒補正を実施後、5-1. 反応速度定数・解離定数の算出を参照して解析を行う。)



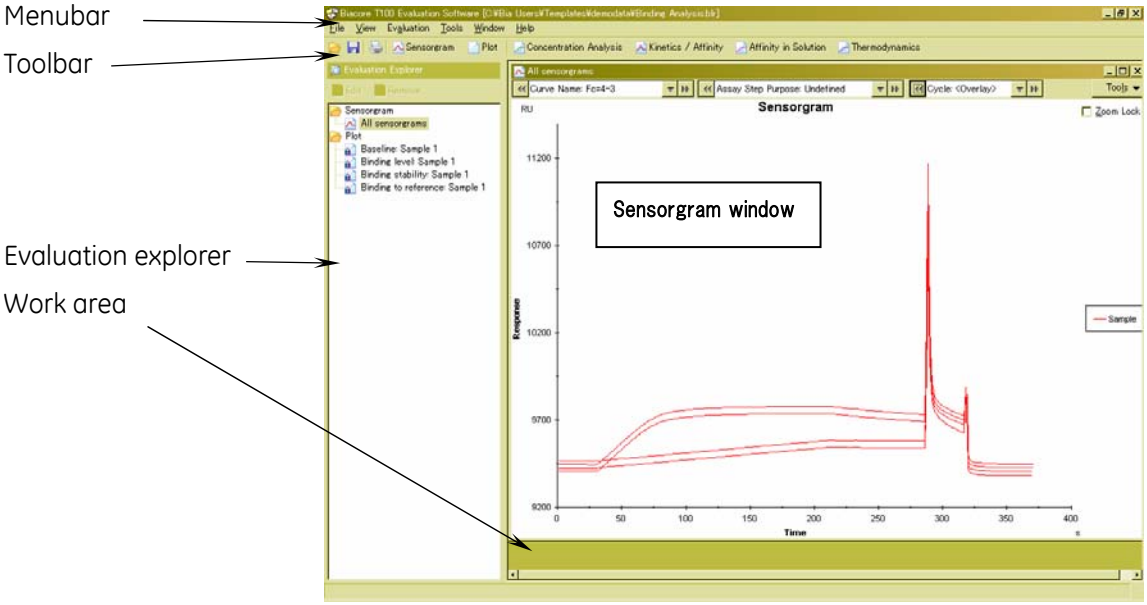
補足 5-48. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table** で変更する。

Tools... → **Keyword Table...**をクリックする。該当箇所を変更後、**Finish** をクリックする。



補足 5-49. 画面の説明

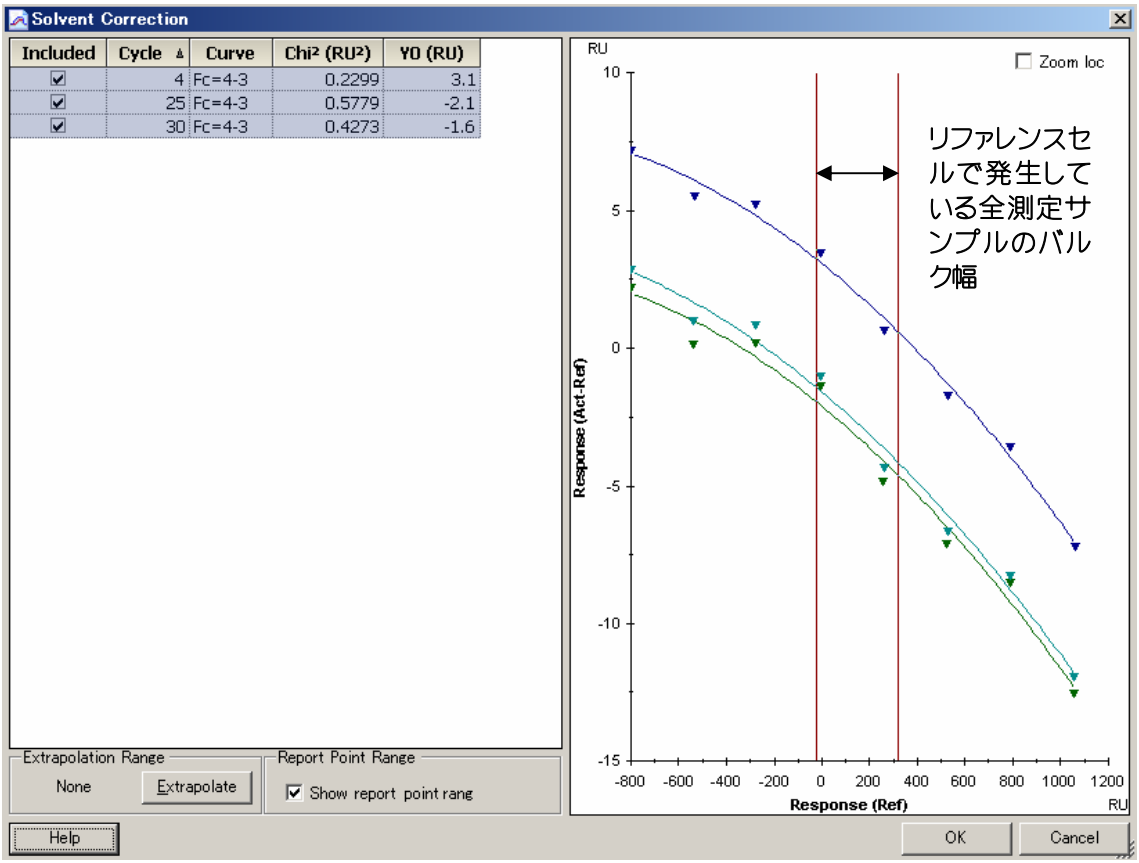


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

溶媒補正

Evaluation → **Add Solvent Correction...**をクリックする。

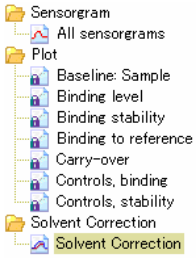
測定サイクル中の溶媒補正用曲線が表示される。



OK をクリックする。

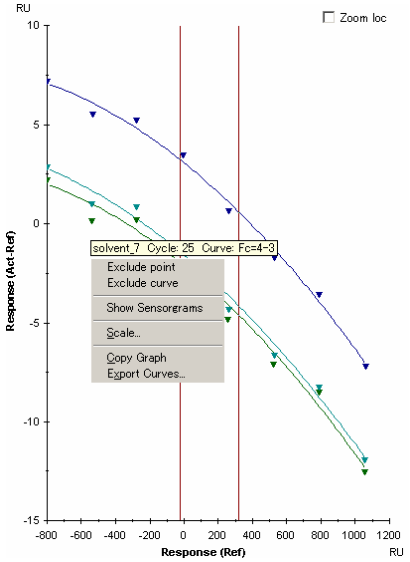
補正が完了する。

溶媒補正用曲線は、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



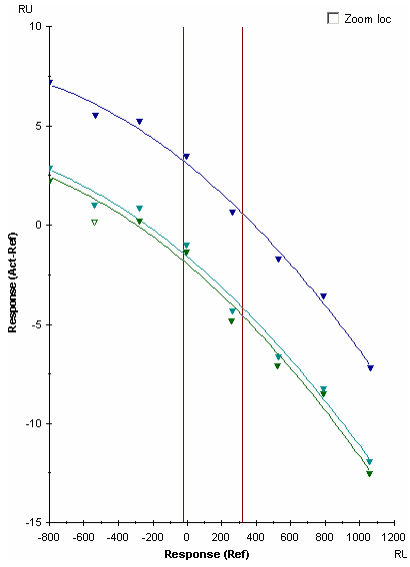
補足 5-50. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、溶媒補正用曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックする。



Exclude point をクリックする。

↓



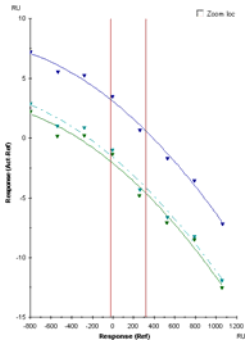
測定ポイントが削除される。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正用曲線が作り直される。

補足 5-51. 溶媒補正用曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正用曲線がある場合、目的の溶媒補正用曲線について、**Solvent correction** 左のボックスの **Include** カラムのチェックをはずす。

Included	Cycle	Curve	Chi² (RU²)	Y0 (RU)
☑	4	Fc=4-3	0.2299	3.1
☑	25	Fc=4-3	0.5779	-2.1
☐	30	Fc=4-3	0.4273	-1.6

↓



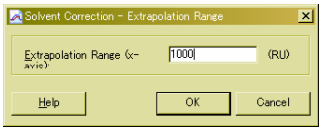
溶媒補正用曲線は削除される。

補足 5-52. 溶媒補正用曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅（＝リファレンスセルに対するバルク幅）を広げることができる。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため、最終結果には注意が必要である。

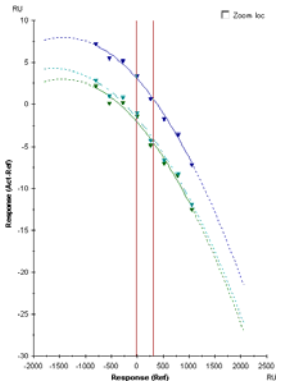
Solvent correction 左下の **Extrapolate** をクリックする。

↓



延長する幅を入力する。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10%を超えないことが望ましい。**OK** をクリックする。

↓



データの評価

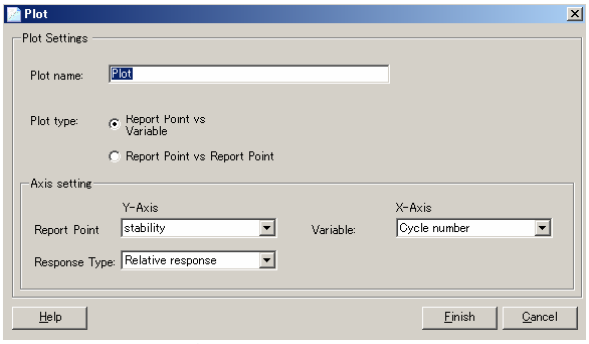
ヒット化合物のランキング評価は、5-3. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照する。低分子化合物アナライトの場合、化合物の分子量差の影響が大きいため、分子量補正をすることにより、真の結合の強さを評価する。以下に、分子量補正の方法を記載する。（反応速度定数・解離定数算出は、5-1. 反応速度定数・解離定数の算出を参照する。）

分子量補正

結合レスポンスを分子量で割り、さらに 100 を掛けた値が補正値である。

Evaluation → **Add Plot...**をクリックする。

↓

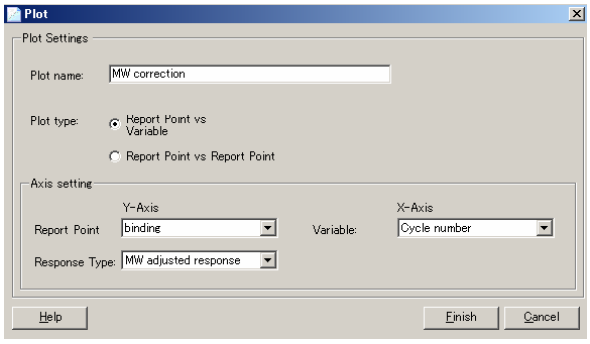


Plot name　プロットデータの名称（例；MW correction）

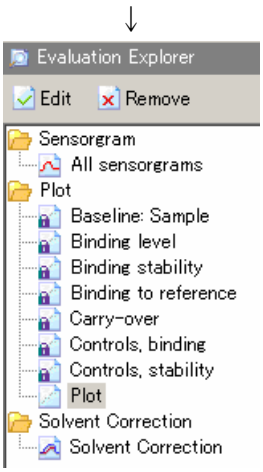
Plot type　プロット様式の設定（Report Point vs Variable）

Axis setting　Y 軸の設定（Report Point：binding、Response type：MW adjustedresponse）

X 軸の設定（Variable：Cycle number）



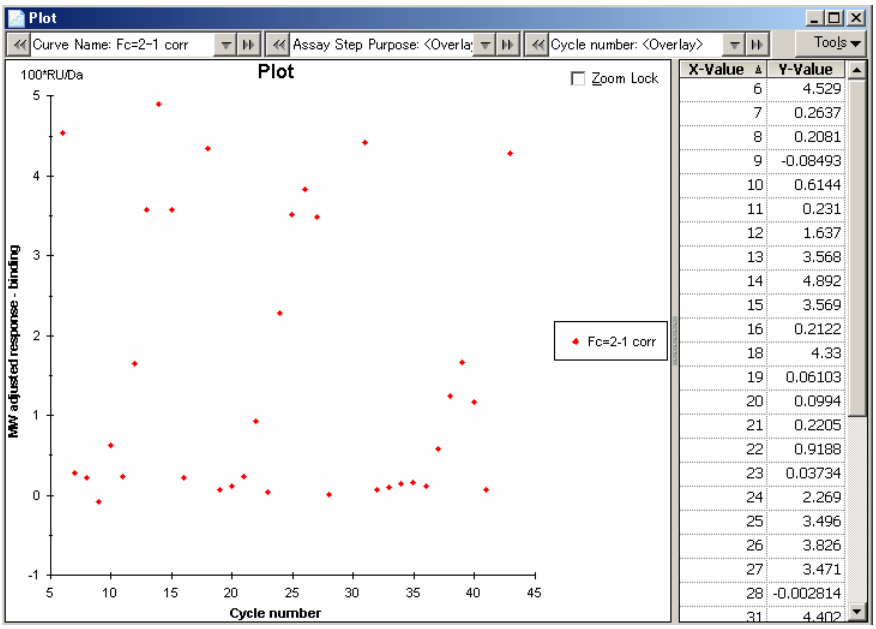
Finish をクリックする。



Evaluation Explorer の **Plot** フォルダに反映される。

ファイル名は、自動で Plot と入力されるので、任意で変更する。

Work area には、分子量補正されたデータが表示される。



評価の詳細は、5-3. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照する。

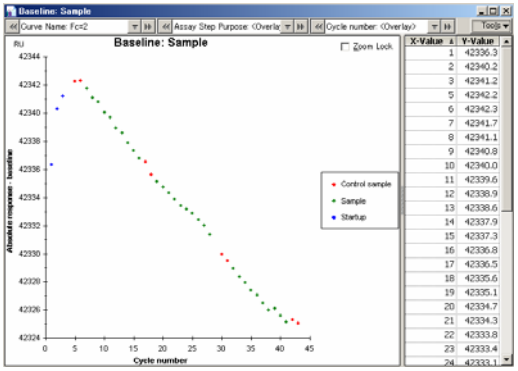
補足 5-53. 測定結果の正当性の評価

Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかどうかを評価する。

ベースラインの変動

Baseline: Sample プロット

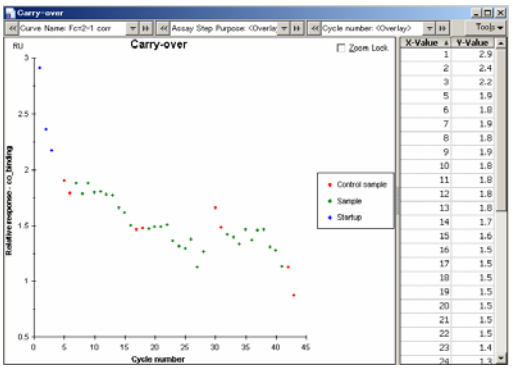
全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプロットが表示される。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになるが、ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていれば良い。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の 10%以上である場合には、それを考慮して評価する必要がある。



キャリーオーバーチェック

Carry-Over プロット

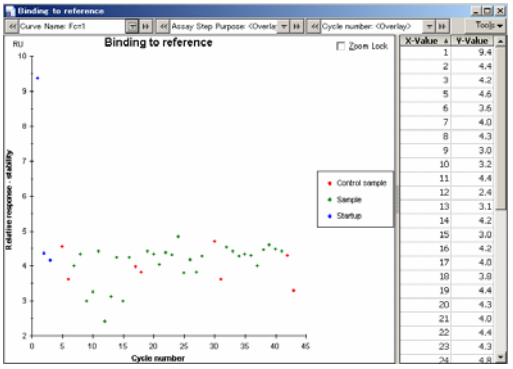
co_binding の co_baseline に対する相対値プロットが表示される。ランニング緩衝液のレスポンス（画面では Startup サイクル）に対して、レスポンスの大きいアナライトはニードルや流路等に吸着する性質を持つ。キャリーオーバーが激しいアナライトの次のサイクルの結合レスポンスは、それを考慮して評価する必要がある。



リファレンスセルへの非特異吸着の確認

Binding to reference プロット

Stability の baseline に対する相対値のプロットが表示される。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価する。ランニング緩衝液のレスポンス以上のサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着する。それを考慮した上で評価を行う。



5-6. 結合アナライトの回収

固定化したリガンドに対して結合したアナライトを回収する。再生溶液を添加し、溶出されたアナライトを引き戻すようにして指定したバイアルに回収する。一回の回収容量はおよそ 2 ul である。効率良く回収を行うためには、アナライトの添加条件と回収溶液の条件が重要となる。

アナライトの添加条件

できるだけ高濃度のアナライトを用いる方が、1 度の添加でより効率よくアナライトを回収することができる。特に低親和性の結合ではアナライト濃度が回収率に大きく影響する。
血清等のアナライトの添加では、センサーチップ表面へ非特異的吸着が生じやすく、目的分子以外の分子も回収される。このような場合には、希釈倍率をあげて非特異的吸着を低減させるなどの検討が必要となる。また、1 度に回収される量は微量であるため、結合量から、何回程度繰り返し結合回収が必要か確認する必要がある。

回収溶液

再生溶液が回収溶液となる。再生できなければ、アナライトを回収することができないので、あらかじめ、マニュアル測定で再生条件を検討する。回収溶液（再生溶液）の種類は、補足 4-1. 再生溶液の種類を参考にする。
質量分析に回収サンプルを直接持ち込む場合は、サンプルを酸性化することが必要である。低濃度の酸は、結合したアナライトを再生するのに適している場合が多く、回収溶液に 0.5% TFA や 0.1% 酢酸を利用すれば、回収サンプル溶液を直接質量分析で解析することができる。
質量分析の前に ZipTipTM (Milipore) などのマイクロ逆相カラムで精製を行う場合には、回収溶液として、アルカリ溶液（50 mM NaOH など）も使用できる。

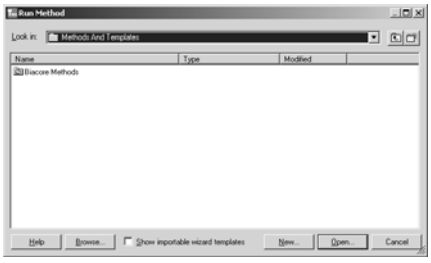
回収前の洗浄溶液

相互作用測定時の緩衝液には、質量分析を阻害する成分（例；NaCl、Surfactant P20、DMSO、リン酸緩衝液など）が多く含まれている。回収サンプル溶液中への、これらの成分の混入を抑えるために、アナライト添加直前にセンサー表面や流路を洗う操作が行われる。その洗浄溶液として、炭酸水素アンモニウムなどの揮発性の緩衝液が用いられる。

5-6-1. プログラムの実行

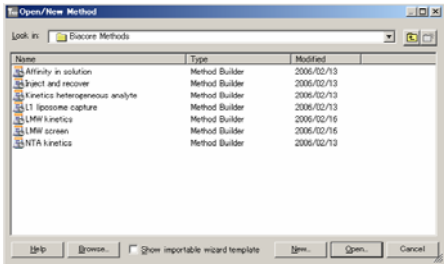
Toolbar の **Run Method** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。

↓



Biacore Methods を選択する。

↓



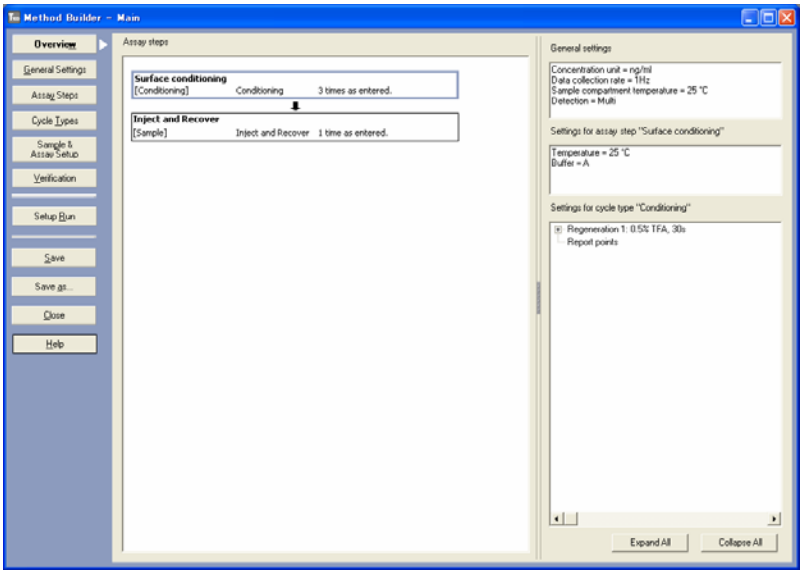
Inject and recover をハイライトにし、**Open...**をクリックする。

↓

Method Builder の **Main** ダイアログが表示される。

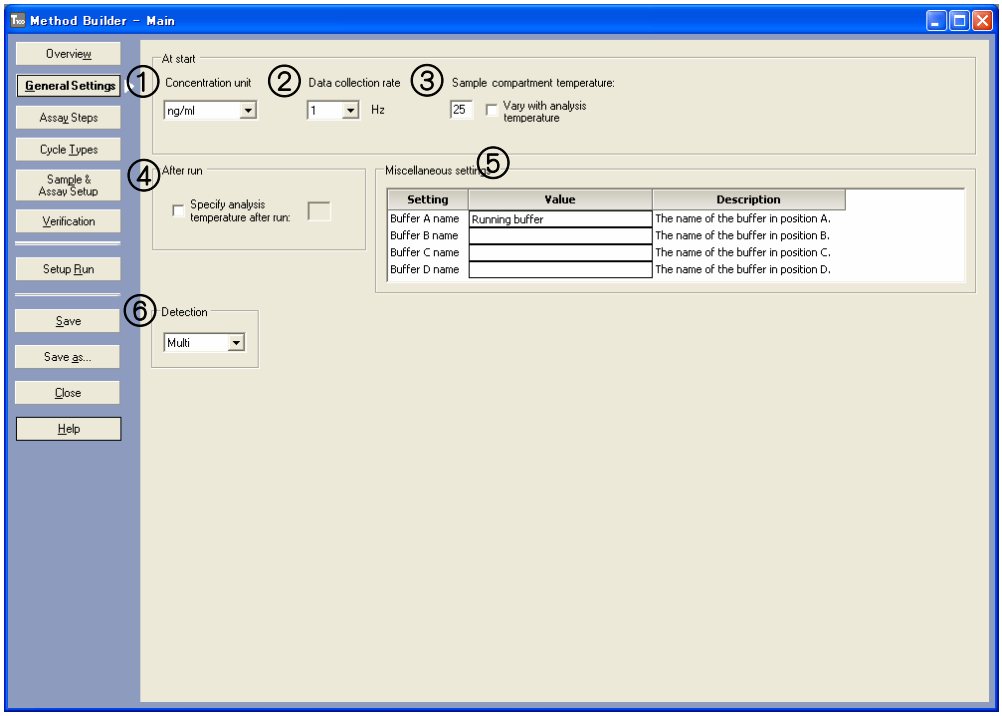
Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示される。

以下に変更項目について記載する。詳細は、6 章を参照。



General settings をクリックする。

↓



① **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択。

② **Data Collection rate**

1Hz を選択。

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4℃～45℃）を設定。通常は、25℃。

④ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後にセンサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

⑤ **Miscellaneous settings**

使用するランニング緩衝液名を入力。

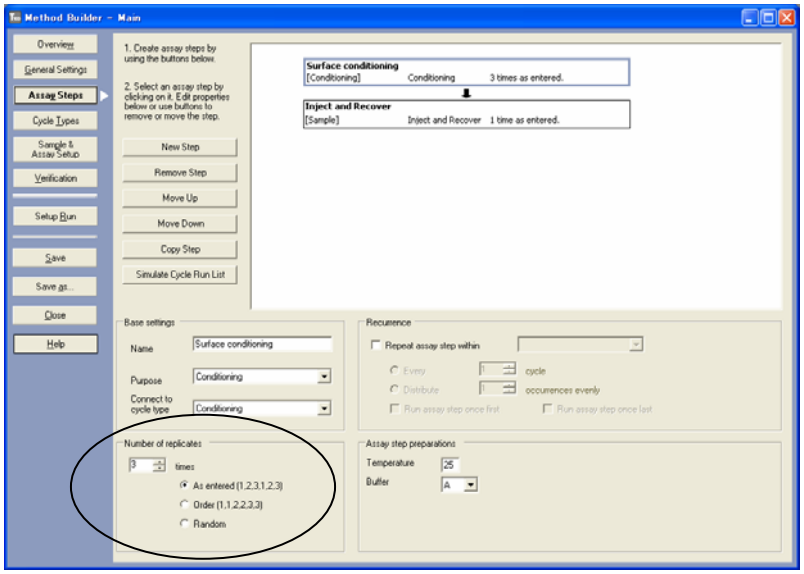
⑥ **Detection**

Multi を選択。設定の変更不可。1、2、3、4 に流れる。

設定後、**Assay Steps** をクリックする。

↓

Surface conditioning をクリックする。



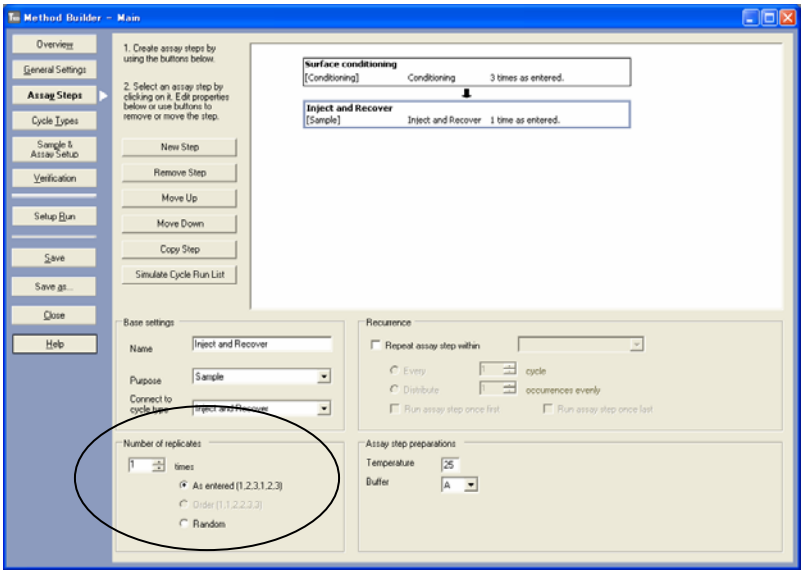
Number of replicates

Times　　スタートアップの測定回数を指定する。3 回以上を推奨。

↓

Injection and Recover をクリックする。

↓



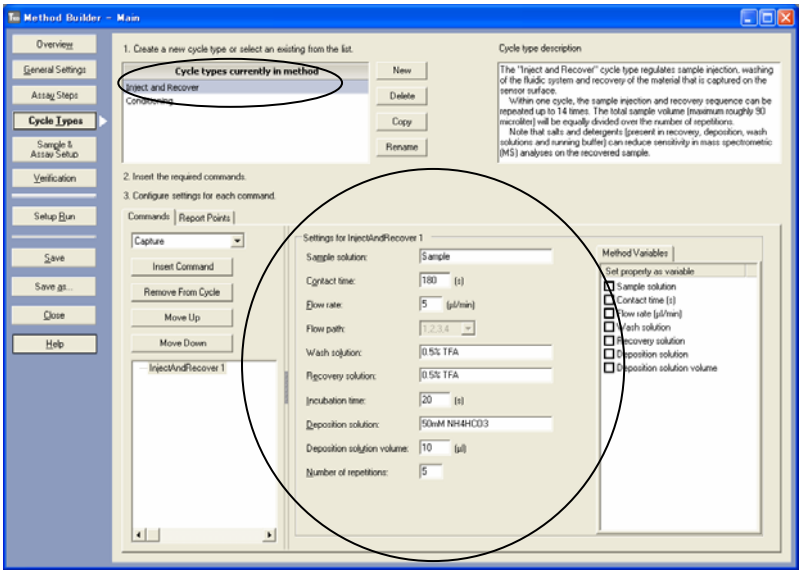
Number of replicates

Times　　回収サイクル数を入力する。

Cycle Types をクリックし、次画面に移動する。

↓

Injection and Recover をクリックする。



Sample solution　アナライトの名称

Contact time　アナライト添加時間（s）

Flow rate　流速（ul/min）

Flow path　1, 2, 3, 4。変更不可。

Wash solution　アナライト添加前のフローシステムの洗浄溶液

Recovery solution　マニュアル測定で条件検討した再生溶液を入力する。
回収溶液は、ランニング緩衝液との希釈を防ぐためにエアーセグメントをはさんでフローセルに添加される。フローセルに到達したところで流速は 0 になり、接触時間（Incubation time）分留まる。

Incubation time　回収溶液の接触時間(s)を入力する。

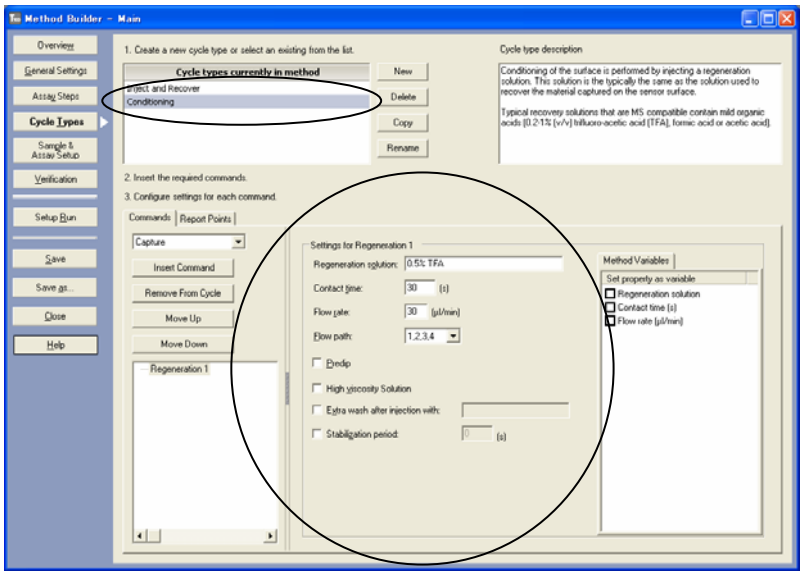
Deposition solution　回収溶液を中和する緩衝液を入力する。また、トリプシンやプロテアーゼなどをセット可能。
アナライト添加前に、回収先となるバイアルに設定容量分を自動分注する。

Deposition solution volume　中和溶液の分注量(ul)を指定する。

Number of repetitions　1 サイクル中の添加・回収回数を入力する。最大 14 回。
回収量を稼ぎたい場合に設定する。

↓

Conditioning をクリックする。



回収サイクル前のセンサーチップのコンディショニング条件の設定を行う。

Regeneration solution　　再生溶液を入力

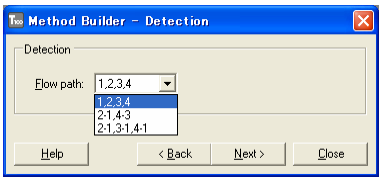
Contact time　　添加時間（s）

Flow rate　　流速（ul/min）

Flow path　　1, 2, 3, 4 を選択

Setup Run をクリックする。

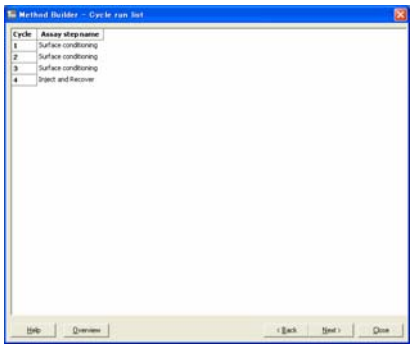
↓



Flow path:　　1, 2, 3, 4 を選択

Next> をクリックする。

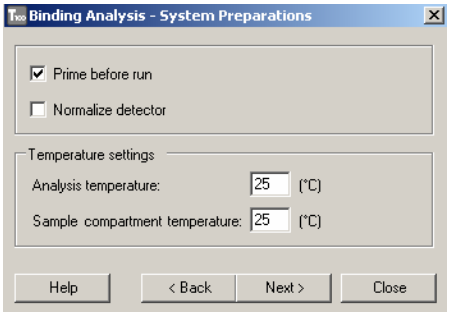
↓



測定サイクルリストが表示される。

Next >をクリックする。

↓



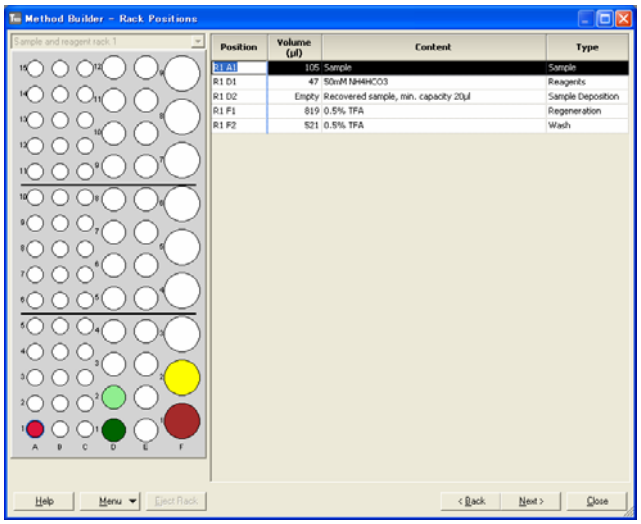
測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Next >をクリックする。

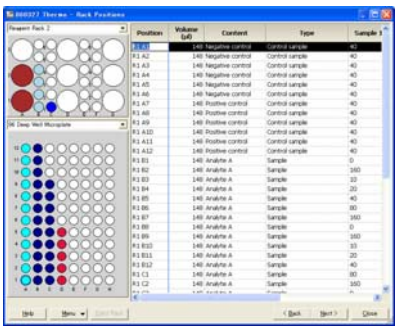
↓



右側の表でサンプルの位置と容量（ul）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

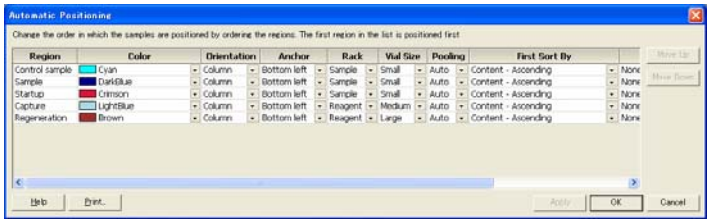
補足 5-54. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

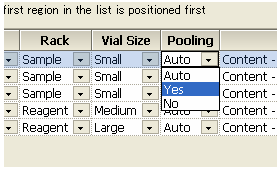
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

↓

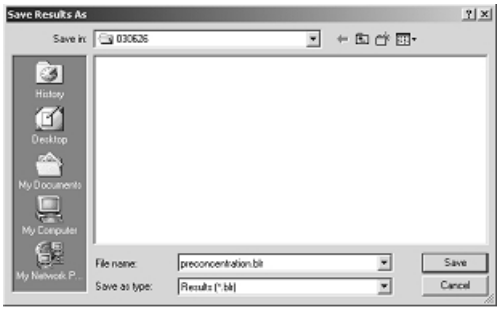
基本的な共通注意事項が表示される。

Start をクリックする。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



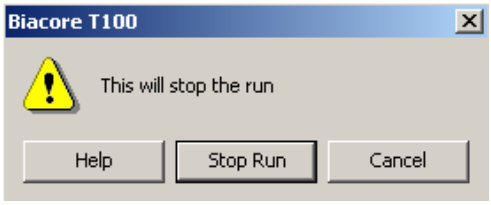
Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

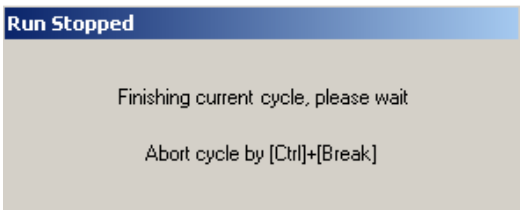
補足 5-55. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



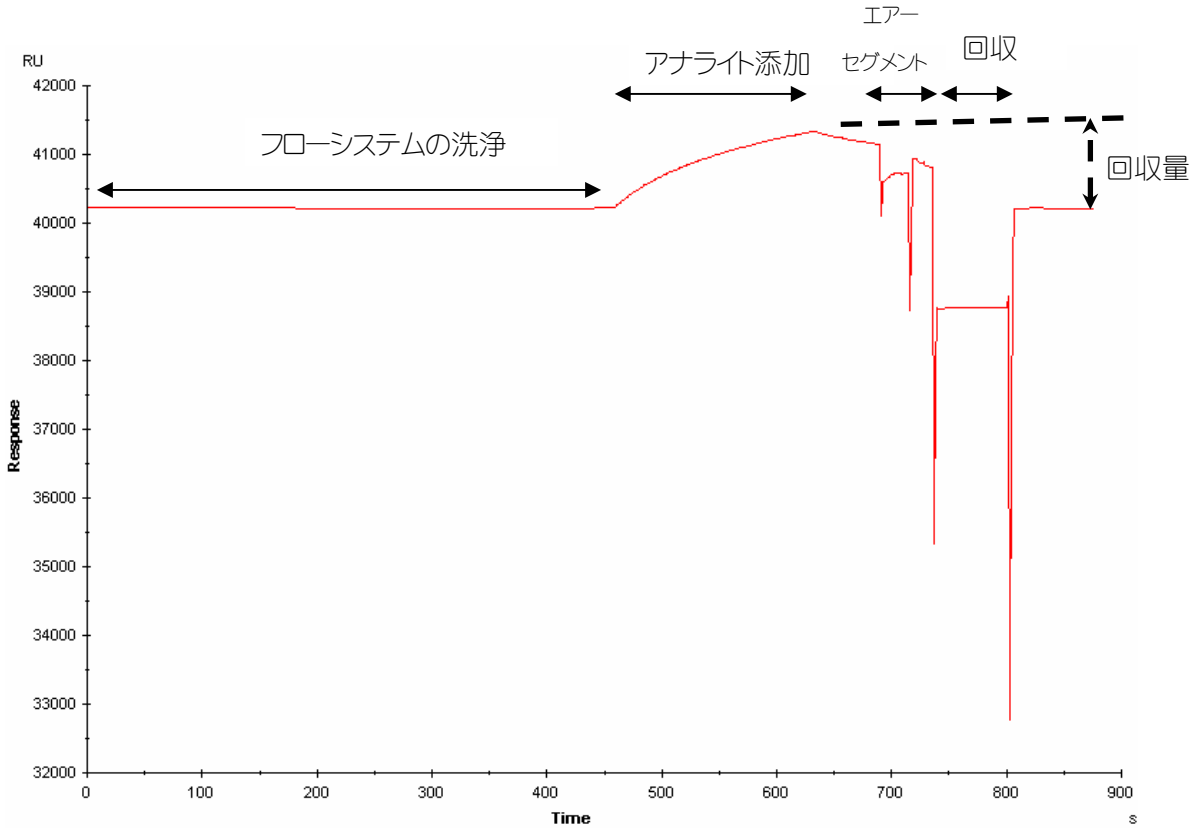
ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

回収のセンサーグラム



回収の評価

1000RU は約 1 ng/mm² の質量変化に相当する。

回収操作終了後 60 秒後に、結合レスポンス（bound）を相対値 0 として計算した回収レスポンス（recovered）が得られる。4 つのフローセルの面積の合計は約 5.8 mm² なので、何 ng 回収できたかを推測することができる。回収レスポンスは、測定結果のレポートポイントテーブルを参照する。

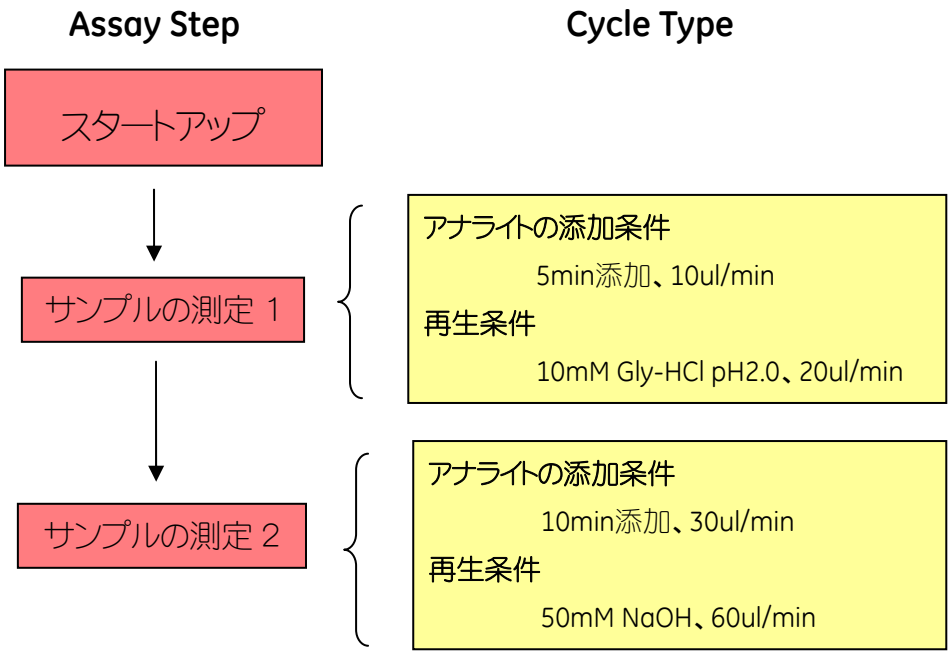
Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
2	440.0	5	40218.2	0.53	0.60	0.00	0.0	Yes	baseline_1
2	680.0	5	41173.9	4.94	0.08	-2.64	955.7	Yes	bound_1
2	885.0	5	40108.7	238.03	199.27	84.33	-1065.2	No	recovered_1

6. メソッドによるプログラムの作成

ウィザードで作成するプログラムには、リファレンスの選択や再生溶液の添加回数などに制約がある。そこで、ウィザードでは対応できない複雑なプログラムを使用したい場合は、メソッドビルダーで望みのメソッドを作成し実行する。作成時には、あらかじめ実験目的に応じたウィザードテンプレートから望みに近いプログラムを作成保存したファイルをメソッドビルダーで編集すると、効率がよく間違いも少なくなる。

メソッドの構成

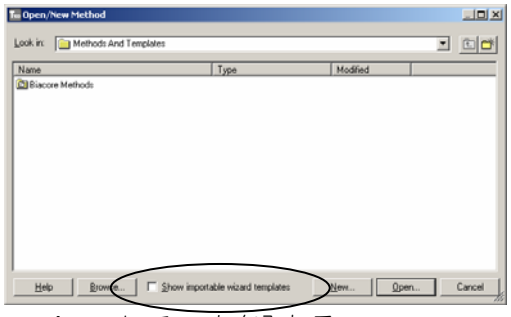
メソッドビルダーの重要な設定項目は“**Assay Steps**”と“**Cycle types**”である。
始めに、**Assay Steps** で測定全体のアウトラインを設定する。一つもしくは複数の測定ステップを設定する。それぞれの測定ステップは Startup、Samples、Control Samples 等の測定目的別で設定する。**Cycle types** は、測定ステップ別に詳細なプログラム（温度、流速、試料の添加順序等）を設定する。



6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し

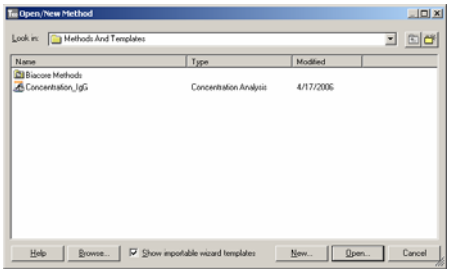
実験目的別に既存のテンプレートがある。既存のテンプレートがない場合には、実験目的に応じたウィザードで実験条件に近いプログラムを作成・保存し、以下の操作に入る。

Toolbar の **Run Method** アイコン( )または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。



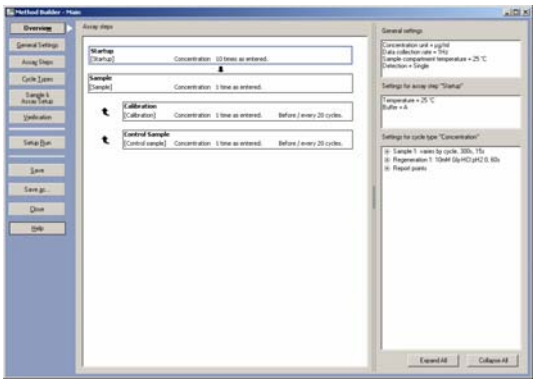
Show importable wizard templates にチェックを入れる。

↓



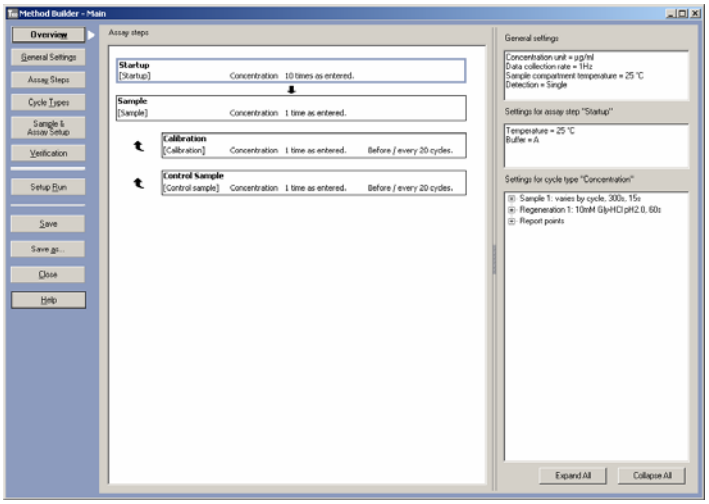
Methods and Templates フォルダ内に保存されているウィザードファイルが表示される。それ以外のフォルダに保存したファイルを呼び出す場合は、**Browse...**を利用する。目的のファイルを選択し、**Open...**をクリックする。

↓



ウィザードで作成したプログラムに入力されていた情報が自動的にメソッドの形式に変換される。ファイルを開いた直後は、メソッドビルダーの **Overview** 画面が表示されている。

6-2. メソッドの編集

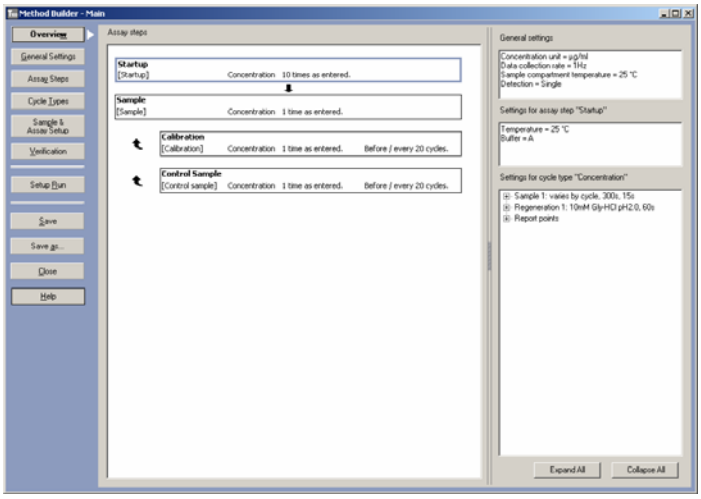


画面左列に設定ボタンが存在する。**General Settings** から **Verification** までの上から 6 つのボタンでメソッドを作成する。

Over view	測定内容の表示
General Settings	システム初期条件の設定
Assay Steps	測定全体のアウトラインの作成
Cycle Types	測定ステップごとの詳細なプログラムの設定
Sample & Assay Setup	変数入力方法の設定
Verifivcation	作成メソッドの確認

↓

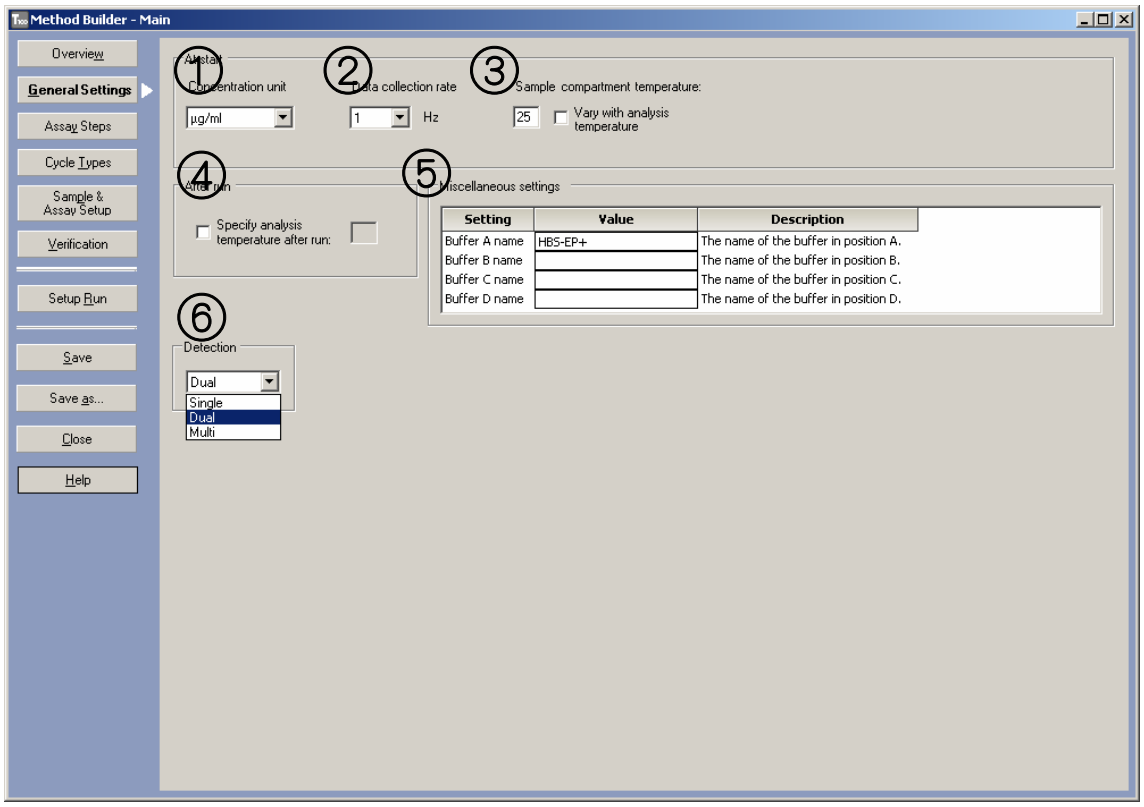
Over view をクリックする。



各項目をクリックすると、右側の画面で測定ステップの詳細を確認することができる。

↓

General settings をクリックする。



General settings では 6 項目の設定を行う。

① **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度を選択する。

② **Data Collection rate**

1 もしくは 10 Hz を選択する。

反応速度定数、熱力学パラメータ算出の場合　10Hz

それ以外の実験目的の場合　1Hz

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4℃～45℃）を設定する。室温より±15℃以内。サンプルコンパートメントの温度は、サンプルの安定性を考慮し、10℃程度に設定することもあるが、DMSO を含むサンプルの場合は、低温で析出することがあるので注意する。

Vary with analysis temperature

チェックを入れておくと、自動的に **Analysis temperature** と同じ温度に設定される。

④ **After run**

この項目にチェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動的に変更される。

⑤ **Miscellaneous settings**

使用するランニング緩衝液名を入力しておくと、記録として残すことができる。

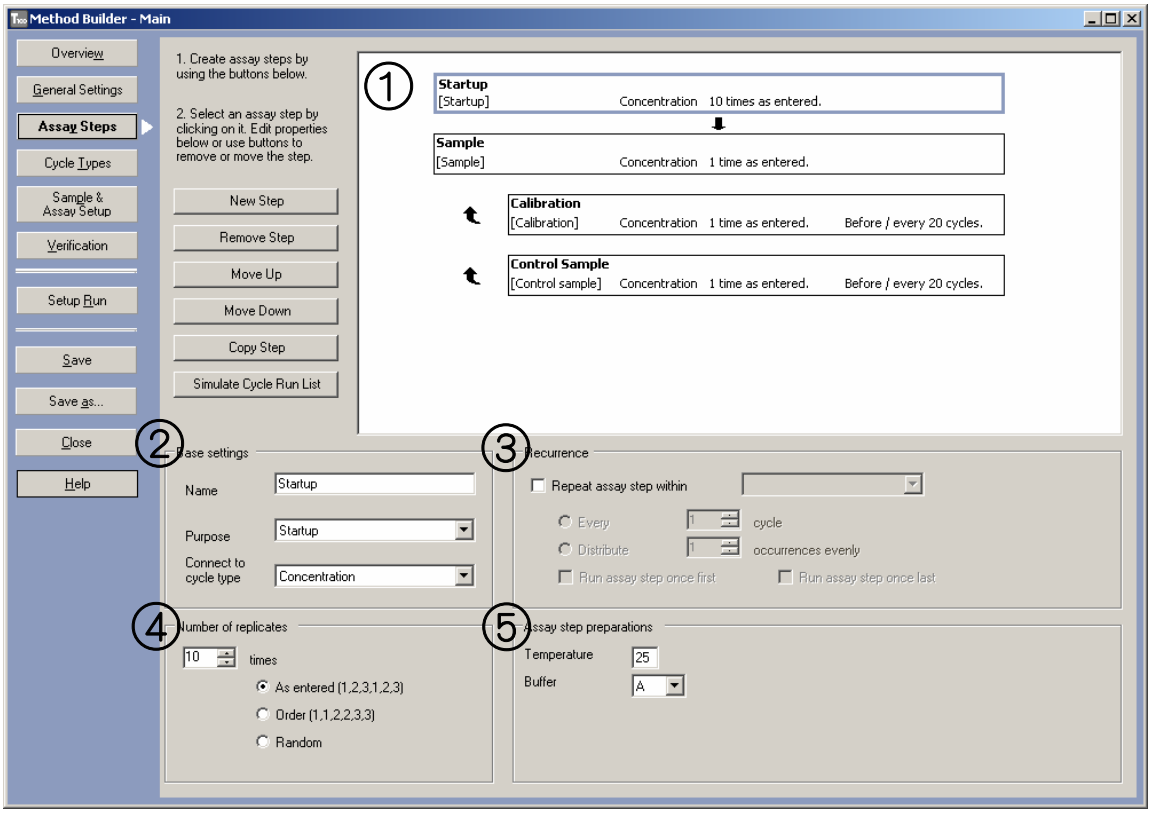
⑥ **Detection**

流したいフローセルに対応した検出モードを以下の 3 つ(Single, Dual, Multi)から選択する。

Single	1、2、3、4
Dual	1,2、3,4、2-1、4-3
Multi	1,2,3,4、2-1, 4-3、2-1,3-1,4-1

↓

Assay steps をクリックする。



Assay steps では 5 つの設定項目がある。アッセイを正しく構築するためには、①、②および③の理解が必須である。

編集したい測定ステップをクリックし、各項目の設定を行う。

① Assay step

測定ステップの作成と各測定ステップの配置を行う。

測定ステップを追加する場合は **New step** から作成できる。新規で作成する測定ステップは、後述する **Purpose** と **Cycle type** の関連づけが必要である。詳細は“補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加”を参照。

各測定ステップの配置は **Move Up** および **Move Down** にて調整する。

なお、濃度測定のウィザードプログラム作成時に検量線の作成、コントロールサンプルの測定を入力している場合は、Calibration、Control sample の測定ステップが表示されている。

② Base settings

Name　測定ステップの名称を入力する。名称は任意であるが、**Purpose** の名称と同一にするのが望ましい。

Purpose　各測定ステップを“何のために”実行するか設定する。

Evaluationsoftware において各測定ステップを適切に認識するために必要かつ重要な項目である。以下の 7 種類がある。

Calibration　**Conditioning**
Control sample　**Sample**
Solvent correction　**Startup**
Undefined

Connect to cycle type

Cycle types 画面で定義したサイクルタイプとの関連づけを行う。サイクルタイプはプルダウンメニューに一覧で表示される。サイクルタイプに関しては、後述する該当項目を参照のこと。ウィザードで作成したプログラムを使用する場合は、自動的に適切な関連づけがされているので、新規のアッセイステップを追加しない限り、特に設定を変更する必要はない。

③ Recurrence

Calibration、Control sample、Solvent correction などをサンプル測定ステップ内で定期的に繰り返し実行するための設定項目である。通常、ウィザードで作成したプログラムを読み込んだ場合はすでに設定されている。必要があれば測定頻度の変更や、サンプル測定ステップの最初と最後に測定する項目を追加できる。詳細は、補足 6-1. 測定ステップの定期的な繰り返し実行の設定を参照のこと。

④ Number of replicates

同一サンプル（コントロールサンプルや検量線用試薬も同じ）について複数回測定したい場合には数値を入力する。合わせて、測定順序を **As Entered**、**Order** および **Random** の中から選択する。

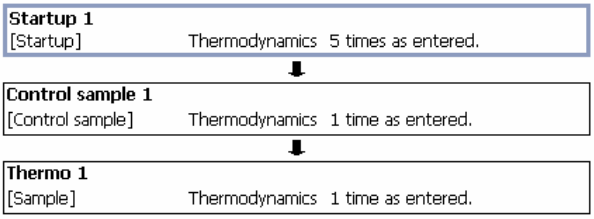
⑤ Assay step preparations

温度の入力とランニング緩衝液の選択を行う。ランニング緩衝液を 1 種類しか使用しない場合は設定する必要はない。（A が選択されている）

↓

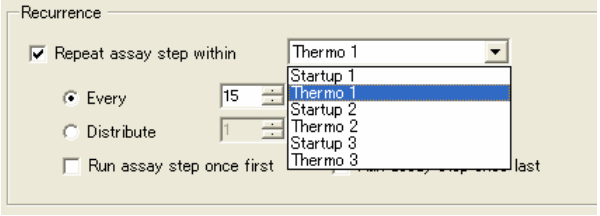
補足 6-1. 測定ステップの定期的繰り返しの実行設定

各ステップは(⇩)の入力順に実行される。

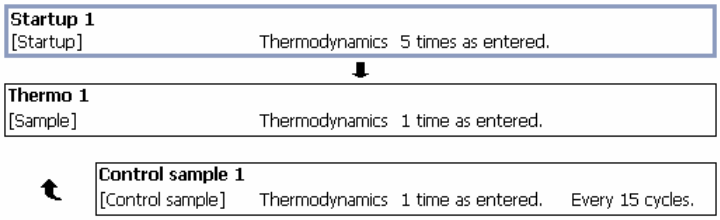


スタートアップ(Startup 1)が実行された後、コントロールサンプル(Control sample 1)の測定ステップを実施、終了後、解析に必要なサンプルの測定ステップ(Thermo 1)が実行される。ここで、コントロールサンプルの測定をサンプル測定中に定期的に繰り返し実行したい場合には、**Recurrence** の設定を行う。

Control sample に該当するステップ(Control sample 1)を選択する。

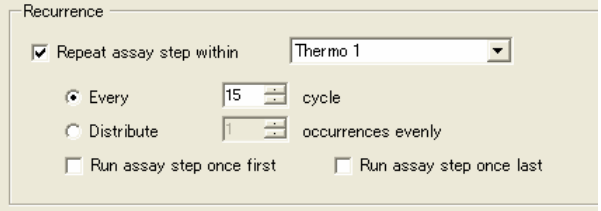


Repeat assay step withinにチェックを入れ、どの測定ステップの中で定期的に測定を実行するかを右側のプルダウンメニューから選択する(アッセイステップ内のすべての測定ステップが表示される)。通常、コントロールサンプルの測定や溶媒補正用曲線の測定はサンプル測定ステップ内(ここではThermo 1)である。



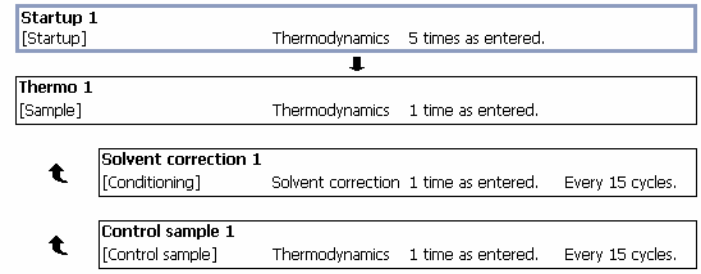
矢印(⇦)は差し込み測定を表しており、矢印が向かっているステップ(ここではThermo 1)の中で実行される。

測定頻度に関しては、**Every** もしくは **Distribute** にチェックを入れて適切な数値を入力する。必要に応じて、**Run assay step once first**(矢印が向かっている先のステップが開始される直前に実施)および **Run assay step once first**(矢印が向かっている先のステップが終了した後に実施)にチェックを入れる。



間隔の確認に関しては、**Simulate Cycle Run List** という機能を使うと便利である。使用方法は補足 6-2. 測定サイクル数の確認および変更を参照のこと。

なお、測定ステップが複数存在する場合は、上から並んだ順に実行される。必要に応じて、**Move Up** および **Move Down** を用いて並び替える。

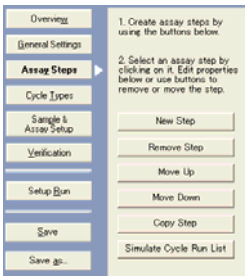


上に示した例ではアナライトが 30 サンプルの場合は以下のように測定が実行される。

↓ **Startup 1**
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control sample 1**
↓ **Thermo 1**　　1 から 15 番目までのアナライト
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control sample 1**
↓ **Thermo 1**　　16 から 30 番目のアナライト

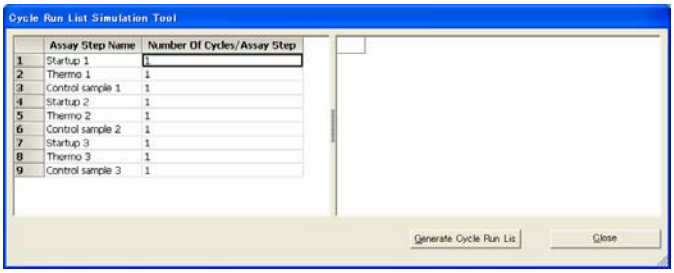
補足 6-2. 測定サイクル数の確認および変更

サンプル測定ステップ内において、溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等はサンプル数に応じて複数回繰り返して実行される。その繰り返し回数の設定は **Recurrence** および **Number of replicates** で設定する。実際にどういう順序で溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等が実行されるか、アッセイステップを作成している際に **Simulate Cycle Run List** で確認ができる。



溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等のステップに関して **Recurrence** および **Number of replicates** を望みの間隔になるように数値等を入力し、**Simulate Cycle Run List** をクリックする。

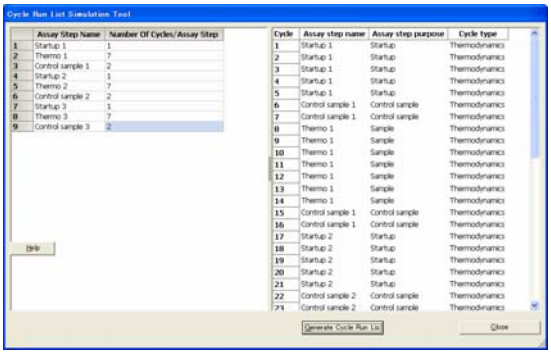
↓


Cycle Run List Simulation Tool
Assay Step Name
Number Of Cycles/Assay Step
1 Startup 1 1
2 Thermo 1 1
3 Control sample 1 1
4 Startup 2 1
5 Thermo 2 1
6 Control sample 2 1
7 Startup 3 1
8 Thermo 3 1
9 Control sample 3 1
Generate Cycle Run Lis
Close

各ステップ名が表示される。**Number of Cycles/Assay step** に、各ステップ内の測定サンプル数を入力する。

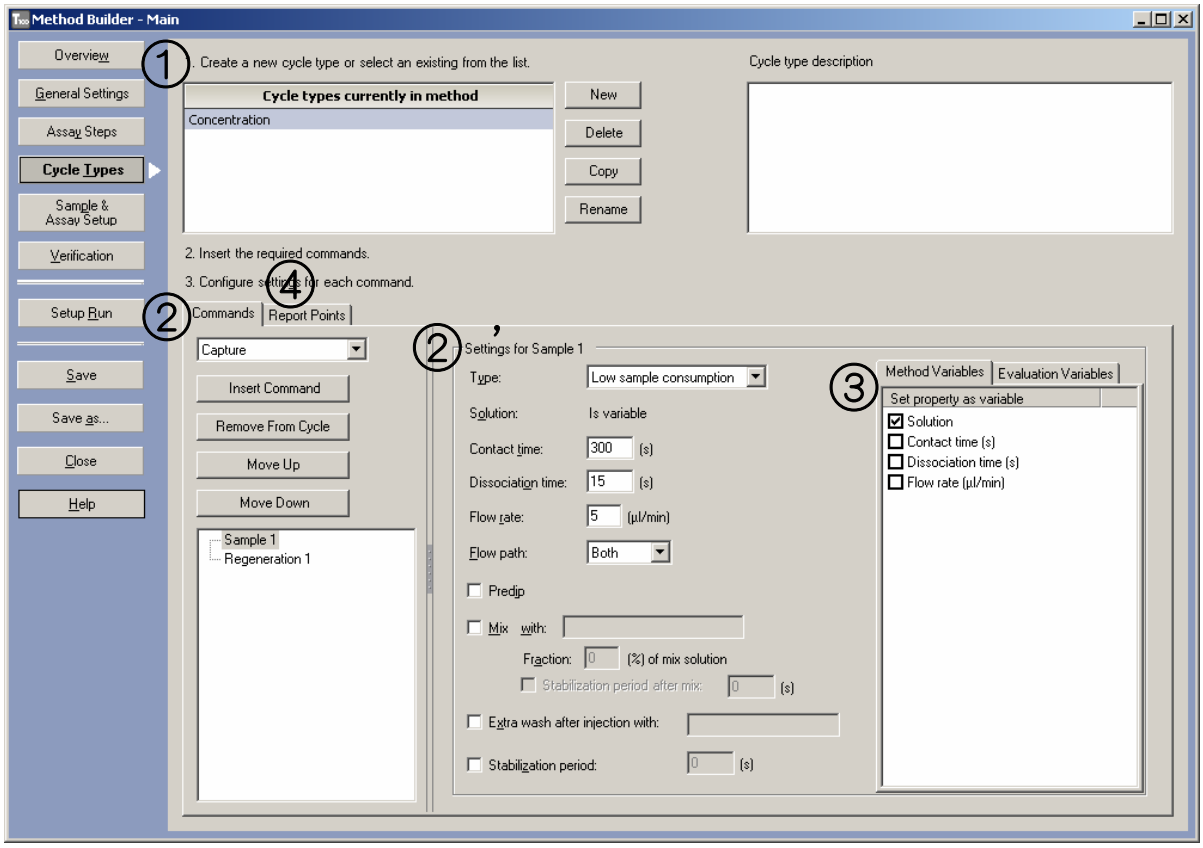
例えば、**Startup**:1、**Thermo**：7、**Control sample**：2 と入力し、**Generate Cycle Run List** をクリックする。

↓



ウィンドウ内の右側に測定サイクルの順番がリスト表示される。望みの並び順になるように、必要に応じて **Recurrence** および **Number of replicates** の設定を変更する。

Cycle types をクリックする。

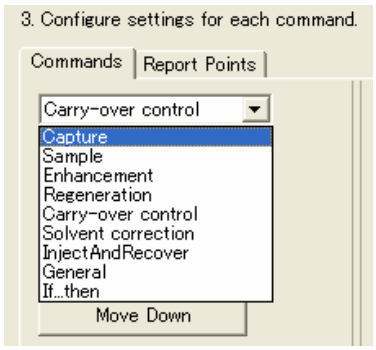


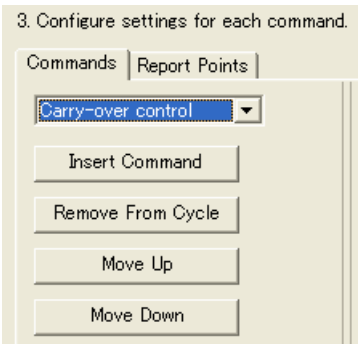
Cycle types では大きく分けて 4 つの設定項目がある。

① サイクルタイプの作成、削除、名前の変更

ウィザードで作成したプログラムを読み込んでいる場合は、通常はここで新たなサイクルタイプを追加する必要はない。作成法の詳細は、補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加を参照。

② 各サイクルのコマンドの設定およびパラメータの入力





各コマンドをプルダウンメニューから選択し、**Insert Command** をクリックして追加する。各コ

マンドの順序は **Move Up** および **Move Down** にて調整する。各コマンドのパラメータの入力は、右隣の画面②'で行う。以下の 9 種類ある。
使用頻度が高いのは **Capture**、**Sample**、**Regeneration** などである。中でも Sample は、Evaluation software で、反応速度定数や親和定数の算出および濃度測定などの解析を実行する際に必須コマンドである。

Sample

測定サンプル（アナライト）の添加コマンド。

Types:　添加モード。

Low sample consumption
サンプルの消費量が少ない。サンプル消費量は、7mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 28 ul。

High performance
サンプル添加時の希釈が少ない。サンプル消費量は、7mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 58 ul。主に、反応速度定数や解離定数の算出時に用いる。

Flow path:　サンプル添加流路。
Detection を **Dual** に設定している場合、以下のフローセルにサンプルが流れる。必要に応じて選択する。

First	2-1 の場合は 1、4-3 の場合は 3
Second	2-1 の場合は 2、4-3 の場合は 4
Both	2-1 の場合は 1 および 2 4-3 の場合は 3 および 4

Detection を **Multi** に設定している場合は、該当するフローセル番号をプルダウンメニューから選択する。

Mix with:　サンプルの混合。
各サンプルは指定された溶液と混合後に添加される。
混合したい溶液の名称を入力する。**Fraction:**にサンプルおよび混合用溶液の“混合比”を入力する。
例えば 20（%）と入力すると、混合用溶液 20%とサンプル 80%が混合される。混合後は、**Stabilization period after mix** に入力された時間が経過した後に添加される。
阻害法を用いた濃度測定実験で使用することが多い。なお、**Mix** 機能を使用する場合には必ず混合用のバイアルが必要

になる。

Extra wash after injection with:

サンプル添加後のフローセル以外の流路の洗浄。
チェックを入れ、洗浄溶液名を入力する。

Stabilization period:　次のコマンド実行までの待機時間。
チェックを入れ、待機時間(s)を入力する。

General

Sampleコマンドと同等の機能をもつが、添加モードに **Dual Inject** の機能が追加されている。**Dual Inject** は、1 つ目のサンプル添加終了後、ランニング緩衝液での自動洗浄をはさむことなく、引き続き 2 つ目のサンプルを添加することができる。ただし、General コマンドで実行したデータは解析にもちこめない。

Capture

リガンドのキャプチャー用添加コマンド。

Enhancement

アナライトの結合確認、またはシグナル増幅として 2 次抗体などの添加コマンド。

Regeneration

再生溶液の添加コマンド。粘性が高い溶液(40%　グリセロール以上)を使用する場合は、**High viscosity solution** にチェックを入れる。

Carry-over control

キャリーオーバーチェックの添加コマンド。
40 ul/min で 30 秒ランニング緩衝液を添加する。Evaluation Software で結合レスポンスからキャリーオーバーを評価する。低分子化合物をアナライトとして添加する場合は、測定サイクルの最後に実施することを推奨する。

Solvent correction

溶媒補正溶液の添加コマンド。
30 ul/min で 30 秒溶媒補正溶液を添加する。溶媒補正溶液を添加する数だけ、コマンドを挿入する。詳細は、5-5.　低分子化合物アナライトの相互作用測定を参照。

InjectAndRecover

結合したアナライトの回収コマンド。5-6. 結合アナライトの回収を参照。

If...Then

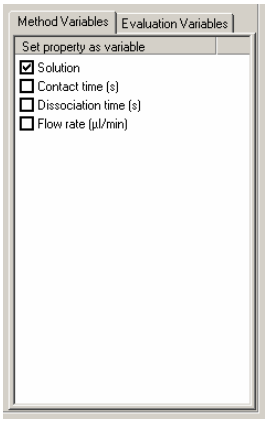
自動判断機能コマンド。

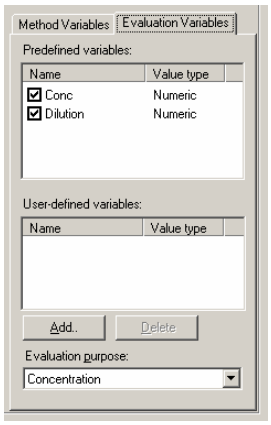
取得したレポートポイントから、その次の操作コマンドを追加または省略したり

プログラム全体を終了させる設定が可能。

③ 各測定サイクルの変数の設定

変数設定には、**Method Variables** と **Evaluation Variables** の2つがある。





Method Variables

各測定サイクルのコマンドおよびパラメータの変数の設定。通常、サンプルコマンドの変数の設定は、Solution にチェックが入っている。測定サイクルごとに添加時間などを変数として設定したい場合は、チェックを入れる。

Evaluation Variables

解析ソフトウェアに反映される変数の設定および解析目的の設定。

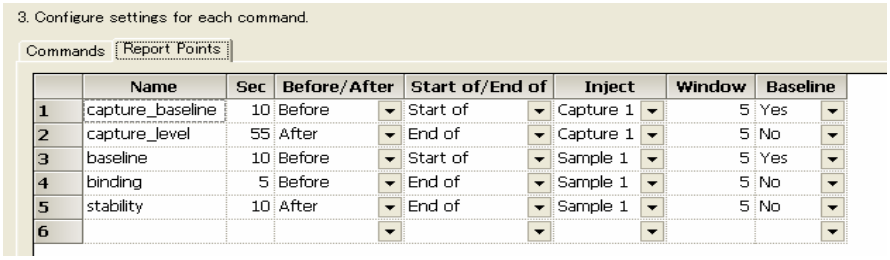
テンプレートのメソッドやウィザードで作成したプログラムを開いている場合、Evaluation purpose に応じて解析に必要な変数はあらかじめ設定されている。それらのチェックははずさないように注意する。チェックが入っていなくても測定自体は実行されるが、Evaluation software による解析は実行できない。

プログラムに定義されていないパラメータを作成する場合は、User defined variables 下の **Add...**をクリックし作成する。**Evaluation purpose** は、**sample** コマンドの設定時のみ表示される。**Evaluation purpose** には以下の 6 種類がある。

Kinetics/Affinity	**Concentration**
Affinity in solution	**Thermodynamics**
Kinetics – heterogeneous analyte	**General**

④ レポートポイントの編集

Report Points タブをクリックすると、各コマンドのレポートポイントの一覧を見ることできる。レポートポイントの追加方法は以下の通りである。


3. Configure settings for each command.

Commands | Report Points

	Name	Sec	Before/After	Start of/End of	Inject	Window	Baseline
1	capture_baseline	10	Before	Start of	Capture 1	5	Yes
2	capture_level	55	After	End of	Capture 1	5	No
3	baseline	10	Before	Start of	Sample 1	5	Yes
4	binding	5	Before	End of	Sample 1	5	No
5	stability	10	After	End of	Sample 1	5	No
6							

Name　レポートポイントの名称を入力。

Sec　Start of / End of および Inject で定義されるイベントから何秒離れた時刻にレポートポイントをとるかを設定。

Before / After　Start of / End of および Inject で定義されるイベントの前後どちら側にレポートポイントをとるかを設定。

Start of / End of　Inject で定義されるイベントの開始時刻および終了時刻のどちらを基準点にするかを設定。

Inject　取得したいレポートポイントと関連づけるイベントをプルダウンメニューから選択。

Window　レポートポイントの値（RU）を算出するための時間幅を設定。通常 5 秒。

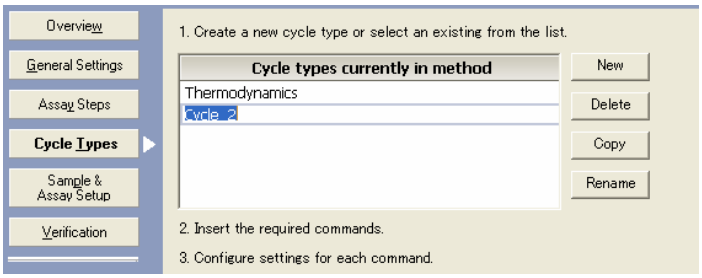
Baseline　該当するレポートポイントをベースライン（相対値 0）にするか設定。

↓

補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加

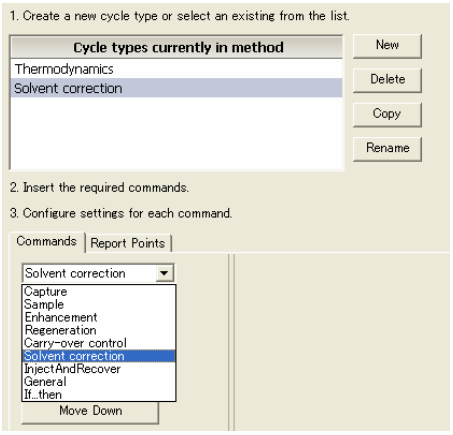
アッセイステップはそのメソッドに存在するいずれかのサイクルタイプと必ず関連づける必要がある。新規のサイクルタイプに関連づけるアッセイステップを新規で追加する場合の流れを示す。ここでは、低分子アナライト測定時に必要な溶媒補正用曲線の作成ステップ（Solvent correction）の追加を例として説明する。

Cycle types 画面にて **New** をクリックする。



Rename で新規サイクルタイプの名称を入力する（ここでは **Solvent correction**）。

↓



Commands タブのプルダウンメニューから **Solvent correction** を選択して、プルダウンメニュー下の **Insert Command** をクリックする。

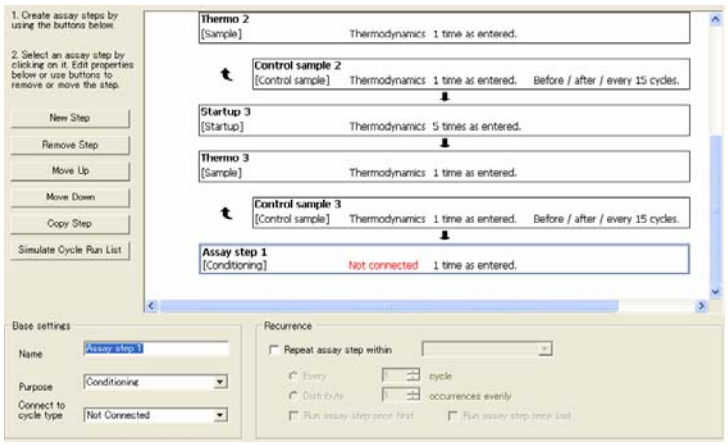
↓

溶媒補正溶液を添加する数だけコマンドを追加したら、新規のサイクルタイプの作成は完了である。

続いて、**Solvent correction** のステップをアッセイステップに追加する。

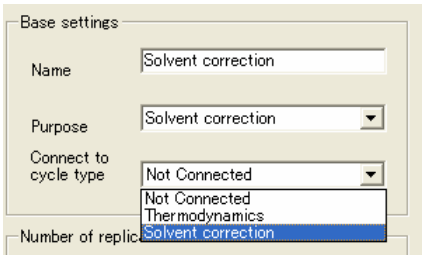
Assay steps ダイアログにて **New** をクリックする。

↓



アッセイステップの最後尾に新規のステップ（ここでは **Assay step 1**）が挿入される。Assay step 1 をクリックして選択し、**Base settings** の設定に移る。

↓



Name　Solvent correction

Purpose　Solvent correction

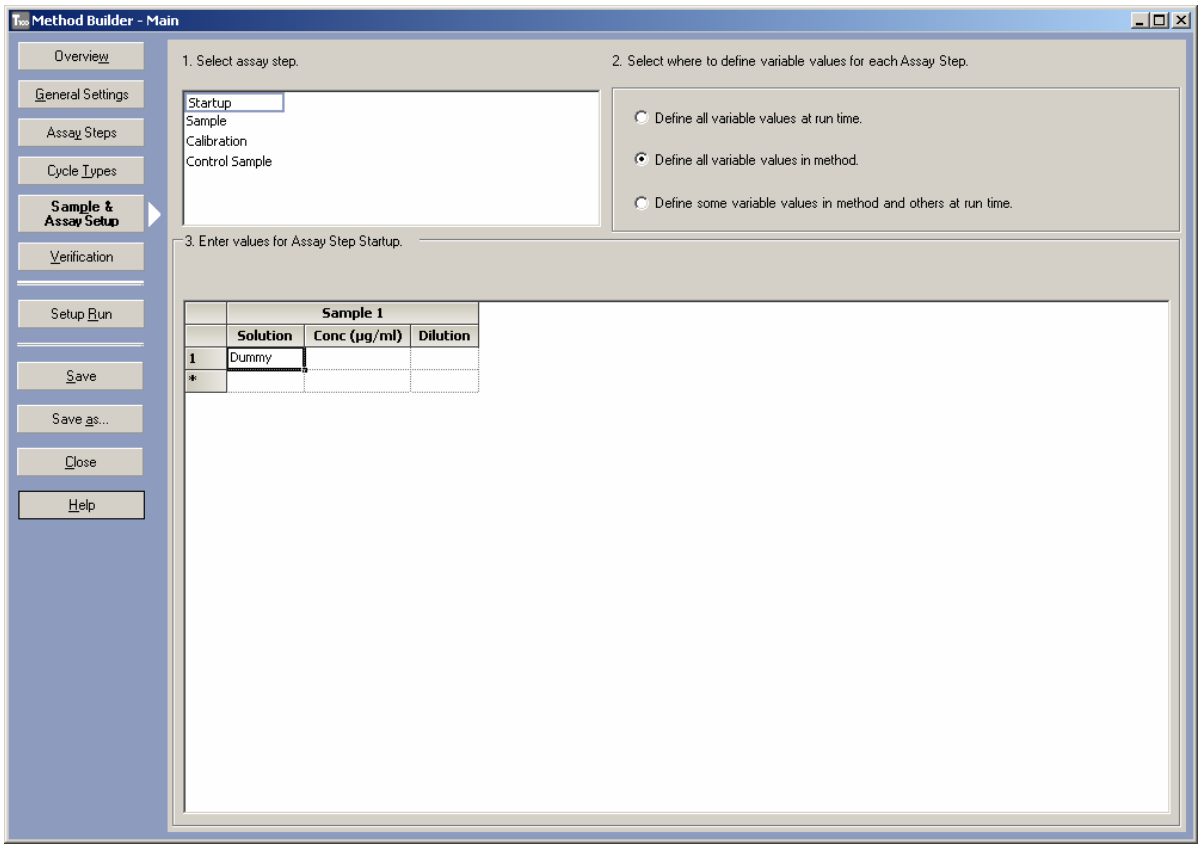
Connect to cycle type　Solvent correction

と設定する。以上でステップの追加は完了する。

↓

追加したステップは必要に応じて **Recurrence**、**Number of replicates**、**Assay step preparations** を適切に設定する。

Sample & Assay Setup をクリックする。



各ステップの変数の入力をどの時点で行うか、画面右上の 3 項目から選択する。

Define all variable values at run time

測定開始直前に入力する。

Define all variable values in method

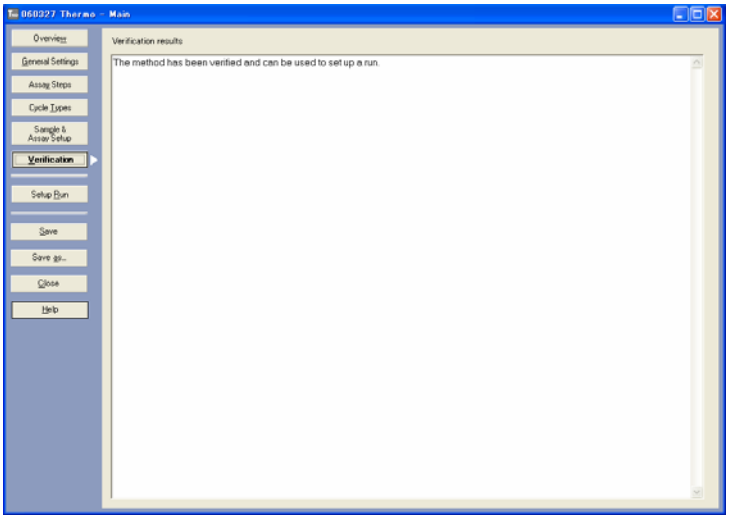
現画面上で入力する。作成したメソッドを頻繁にテンプレートとして使用し、毎回変更がない場合は、ここで入力しておくと、測定直前での情報入力が不要になるので便利である。

Define some variable values in method and others at run time

幾つかの情報を現画面上で入力し、その他の情報は測定開始直前に入力する。

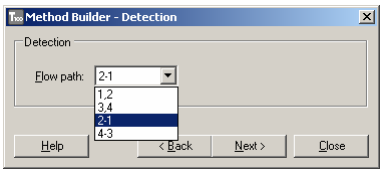
↓

Verification をクリックする。



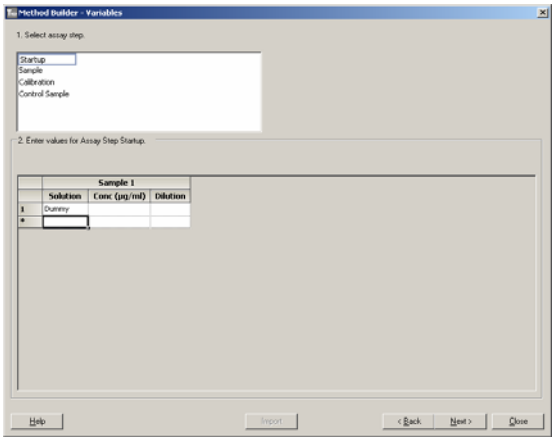
メソッドの設定に不備がなければ **"The method has been verified and can be used to set up a run."** と表示される。問題が有る場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正する。
確認後、**Setup Run** をクリックする。

↓



適切な **Flow path** を選択し、次へ進む。

↓



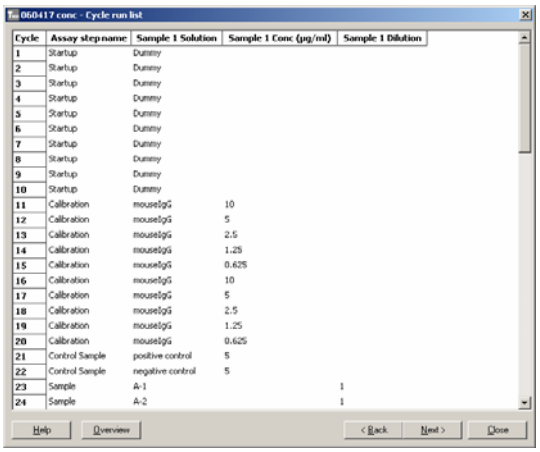
Sample & Assay Setup のすべてのステップについて必要事項を入力する。
"**Define all variable values at run time**" を選択したステップは、この時点でサンプル情報の入力が必要となる。各ステップをクリックすると、画面下にサンプル情報を入力できるようになる。入力する必要のないカラムが出てきた場合は、空欄のまま次に進む。

補足 6-4.Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

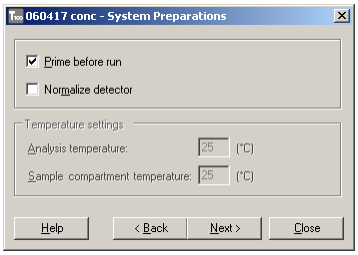
すべての項目を入力後、**Next >**をクリックする。

↓



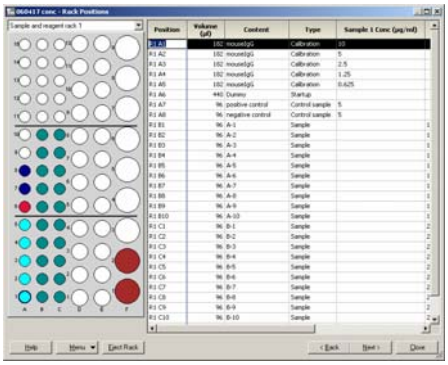
サイクルリストが表示される。上から順番に測定が実行される。
問題がなければ、**Next >**をクリックする。

6-3. メソッドの実行



測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** を行う設定ができる。
設定後、**Next >**をクリックする。

↓



右側の表でサンプルの位置と容量（ul）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 6-5. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Import Positions...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

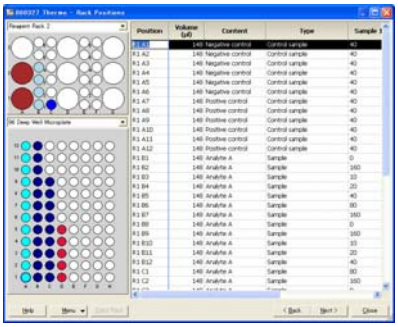
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Start** をクリックする。

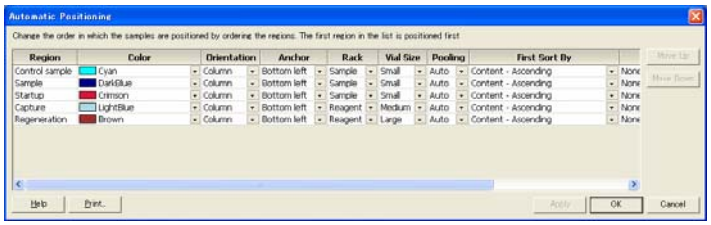
補足 6-6. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning** を選ぶ。

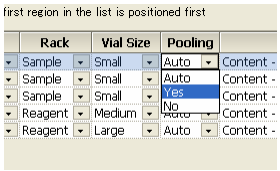
↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

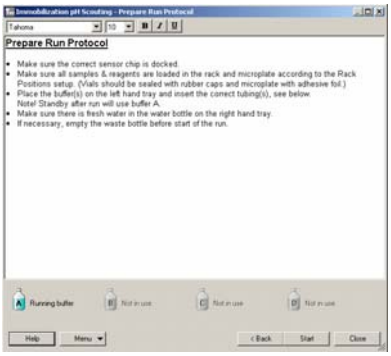
↓



同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

↓

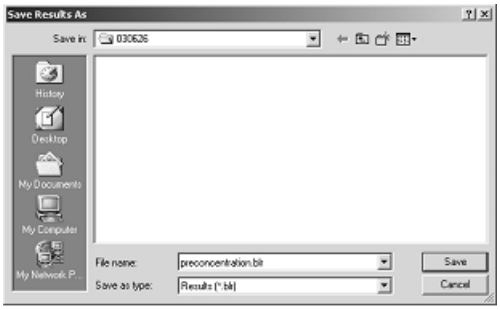

Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Running buffer
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

測定時の基本的な共通注意事項が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

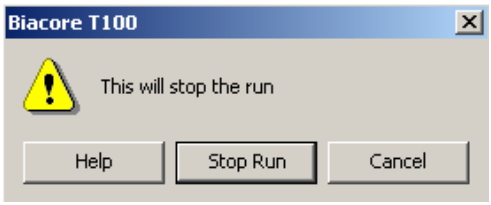
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。
解析およびデータの評価は各章を参照。

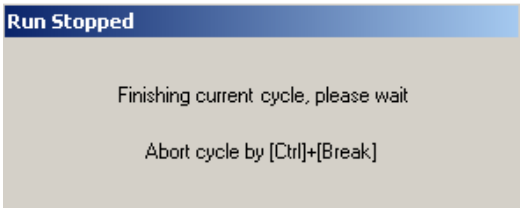
補足 6-7. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

7. メンテナンス

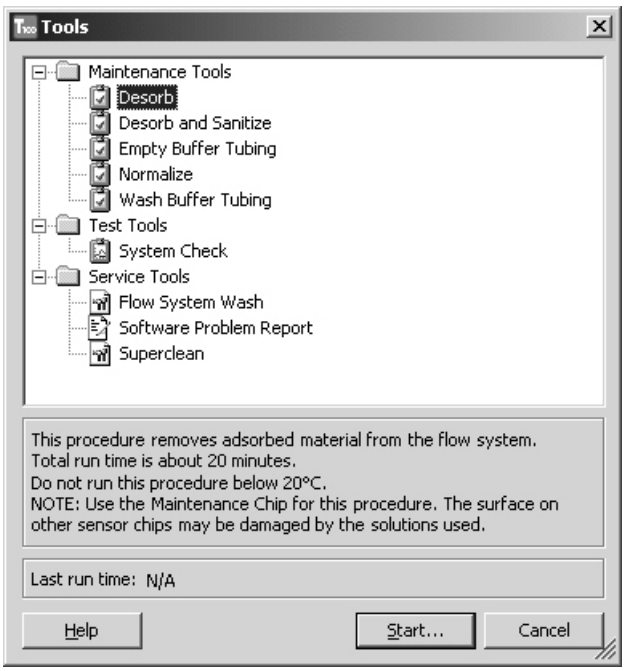
システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム（Menu bar の **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**）を実行することによって行う。
ランニング緩衝液として、超純水を使用する。また、メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは破壊されてしまうので、必ず **Sensor Chip Maintenance**（もしくは使用済みセンサーチップ）を使用すること。

メンテナンスコマンドの呼び出し

Menu bar の **Tools** → **More Tools...**を選択する。

↓

Tools ダイアログが表示される。



各コマンドを選択すると内容が確認できる。

メンテナンスに必要な試薬

通常のメンテナンスに必要な試薬は、Biacore Maintenance Kit, type 2（BR-1006-51）に含まれている。

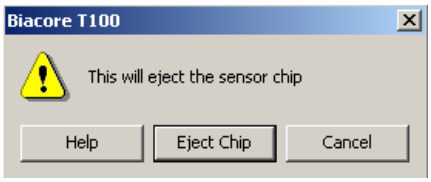
BIAdesorb solution 1	95 ml x 2
BIAdesorb solution 2	95 ml x 2
BIAtest solution	65 ml
BIAdisinfectant solution (conc.)	10 ml x 3
BIAnormalizing solution	90 ml
HBS-N buffer	10 X 50 ml
Sensor Chip Maintenance	1 枚

BIAdesorb solution 1 は 4 ℃で保存すると結晶が析出する。BIAdesorb solution 1 のみ室温保存（その他のキット試薬は、4 ℃保存）。

補足 7-1. メンテナンスチップへの交換方法

Toolbar の **Eject** アイコン( )または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択する。

↓

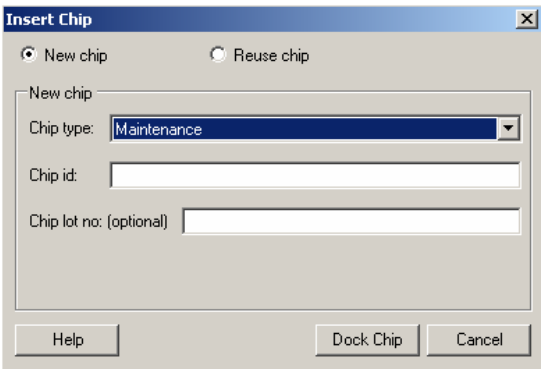


Eject Chip をクリックする。

↓

センサーチップポートが開くのでセンサーチップを取り出し、メンテナンス用センサーチップ（Sensor Chip Maintenance）をセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換する。

↓



Insert Chip ダイアログが表示されるので **Chip type: Maintenance** を選択後、**Chip id;**を入力し、**Dock Chip** をクリックする。

Dock が完了すると自動的に **Standby flow** 状態になる。

Dock 終了後は、超純水で **Prime** を実行する。

7-1. システムの洗浄

7-1-1. Desorb

IFC および、サンプルチューブに付着した汚れ等を洗浄する操作。

1 週間に 1 回必ず実施する。所要時間は、約 20 分。

20 ℃以上の設定温度で行う。(**Sample compartment** 温度も 20 ℃以上)

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1 (0.5 % SDS)

BIAdesorb solution 2 (50 mM Gly-NaOH、pH 9.5)

ランニング緩衝液

チューブ A に超純水をセットする。

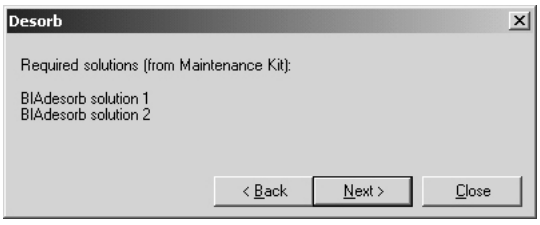
Maintenance Tools → **Desorb** を選択して **S**tart...をクリックする。

↓

Desorb
This procedure removes adsorbed material from the flow system. Total run time is about 20 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**N**ext >をクリックする。

↓



内容を確認後、**N**ext >をクリックする。

↓

BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を 16 mm ガラスバイアルまたは、15 mm プラスチックバイアルに、それぞれ 1650 ul 分注してラックポジションにセットする。

Start をクリックする。

↓

Desorb 終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になる。そのままの状態で 3～4 時間放置か、もしくは **Prime** を 3 回実施する。

7-1-2. Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムの滅菌および、洗浄を行う。

1ヶ月に1回必ず実施する。所要時間は、約1時間。

20 ℃以上の設定温度で行う。(サンプルコンパートメント温度も20 ℃以上)

洗浄したいバッファーチューブ(チューブ A, B, C, D)の洗浄後、A以外のチューブ(チューブ B, C, D)を空にして終了する。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1(0.5 % SDS)

BIAdesorb solution 2(50 mM Gly-NaOH、pH 9.5)

BIAdisinfectant solution　　原液 6 ml を超純水 80 ml に加えて使用

ランニング緩衝液

超純水

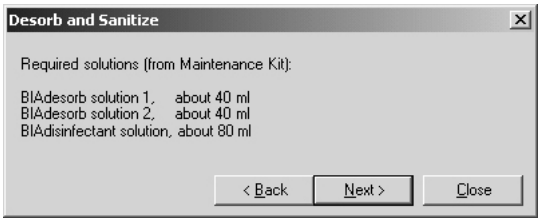
Maintenance Tools → **Desorb and Sanitize** を選択して **Start...**をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize
This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system.
The procedure is divided into five steps. Total run time is about one hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

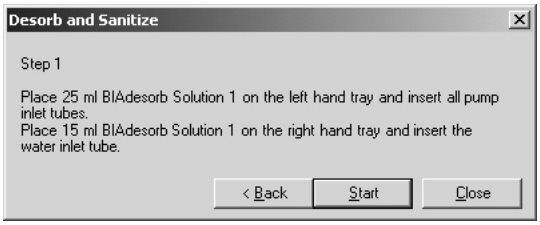
内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓


Desorb and Sanitize
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1, about 40 ml
BIAdesorb solution 2, about 40 ml
BIAdisinfectant solution, about 80 ml
< Back
Next >
Close

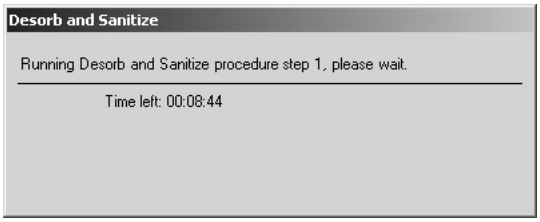
内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓


Desorb and Sanitize
Step 1
Place 25 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert all pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 1 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

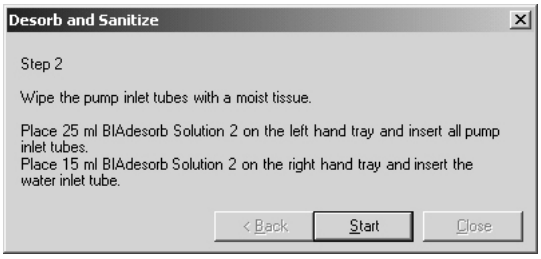
BIAdesorb Solution 1 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注する。
本体左側のチューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 1 ボトル（25 ml）にセットする。本体右側の MilliQ®チューブを、BIAdesorb Solution 1 ボトル（15 ml）にセットする。**Start** をクリックする。

↓



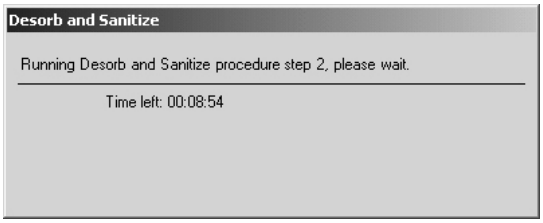
ステップ1の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。

↓


Desorb and Sanitize
Step 2
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 25 ml BIAdesorb Solution 2 on the left hand tray and insert all pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 2 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

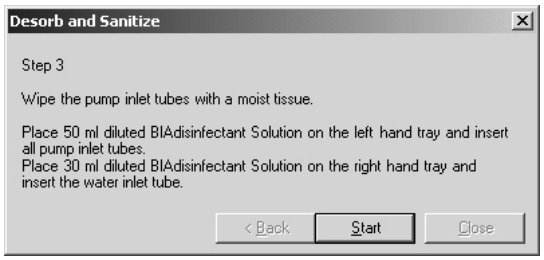
BIAdesorb Solution 2 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注する。
チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 2 ボトル（25 ml）にセットする。MilliQ®チューブを、BIAdesorb Solution 2 ボトル（15 ml）にセットする。**Start** をクリックする。

↓



ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。

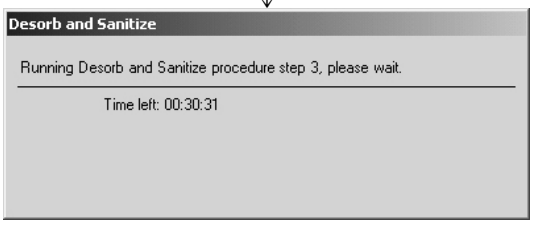
↓


Desorb and Sanitize
Step 3
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 50 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the left hand tray and insert all pump inlet tubes.
Place 30 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

BIAdisinfectant Solution を 50 ml, 30 ml の 2 本に分注する。

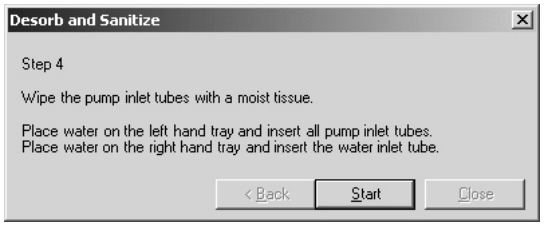
チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdisinfectant Solution ボトル（50 ml）にセットする。MilliQ®チューブを、BIAdisinfectant Solution ボトル（30 ml）にセットする。**Start** をクリックする。

↓



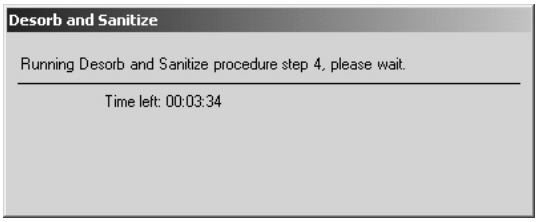
ステップ 3 の終了後、自動的にステップ 4 のダイアログが表示される。

↓


Desorb and Sanitize
Step 4
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place water on the left hand tray and insert all pump inlet tubes.
Place water on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

チューブ A, B, C, D は、すべて超純水ボトル（ランニング緩衝液ボトル）に戻す。MilliQ®チューブを、超純水ボトルに戻す。**Start** をクリックする。

↓

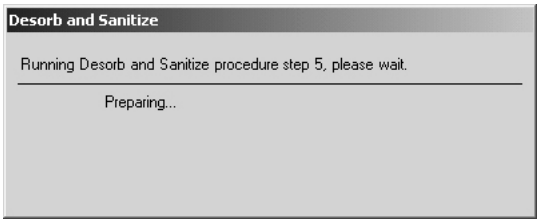


ステップ 4 の終了後、自動的にステップ 5 のダイアログが表示される。

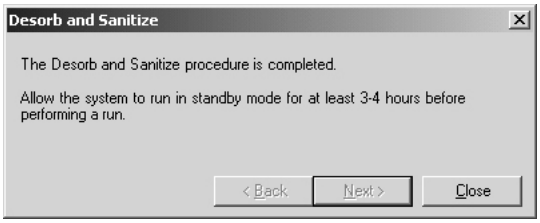
↓

チューブ A は、超純水に残したまま、チューブ B, C, D は、超純水から出して空気を吸える様にする。
Start をクリックする。

↓



↓



ステップ 5 の終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になる。この状態で 3～4 時間放置する。
もしくは、Prime を 3 回実施する。

↓

Close をクリックし、洗浄を終了する。

7-1-3. Empty Buffer Tubing

B,C および D のバッファーチューブを超純水で洗浄後、チューブの中身を空にする操作。

Buffer scouting またはシステムチェックで B,C および D のチューブを使用後、使用する予定がない場合に実行する。所要時間は、約 20 分。

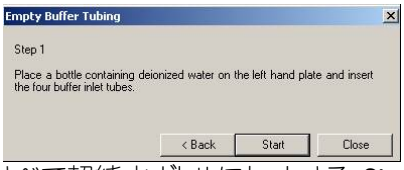
ランニング緩衝液

超純水

70%エタノール溶液

Maintenance Tools → **Empty Buffer Tubing** を選択して **Start...**をクリックする。

↓



本体左側のチューブ A,B,C,D をすべて超純水ボトルにセットする。**Start** をクリックする。

↓

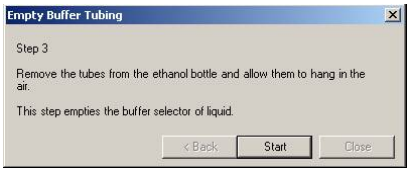
ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。

本体左側のチューブ A,B,C,D を、すべて 70%エタノール溶液のボトルにセットする。

Start をクリックする。

↓

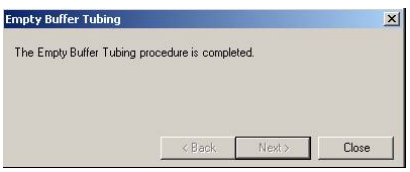
ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。



本体左側のチューブ A,B,C,D を、70%エタノールから出して空気を吸えるようにする。

Start をクリックする。

↓



終了後、B,C および D のチューブは、チューブホルダーに収納する。

7-1-4. Wash Buffer Tubing

A,B,C,D のバッファーチューブを洗浄する操作。

界面活性剤または BSA 等、吸着しやすい物質を含んだランニング緩衝液を使用後、それらの物質を含んでいないランニング緩衝液に切り替えて実験する場合に実行する。

所要時間は、約 30 分。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

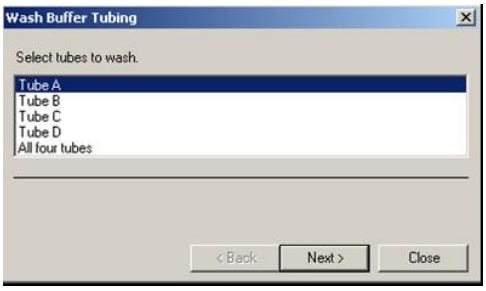
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

ランニング緩衝液

超純水

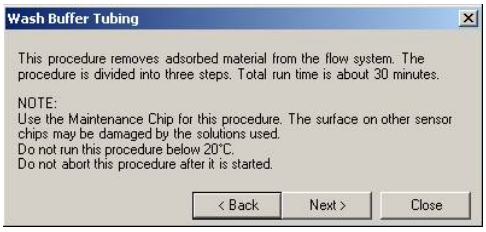
Maintenance Tools → **Wash Buffer Tubing** を選択して **Start...**をクリックする。

↓



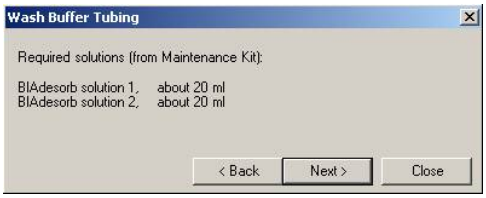
洗浄するチューブを選択し、**Next >**をクリックする。

↓


Wash Buffer Tubing
This procedure removes adsorbed material from the flow system. The procedure is divided into three steps. Total run time is about 30 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓


Wash Buffer Tubing
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1, about 20 ml
BIAdesorb solution 2, about 20 ml
< Back
Next >
Close

Next >をクリックする。

↓

最初に選択したチューブを BIAdesorb Solution 1 ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。

チューブを BIAdesorb Solution 2 ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。

チューブを超純水ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

ステップ 3 終了後、使用しないチューブはチューブホルダーに収納する。

7-2. シグナルの校正

7-2-1. Normalize

センサーチップの種類を変更した場合や、低分子化合物をアナライトとするような場合には、測定前に実施することを推奨する。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAnormalizing solution

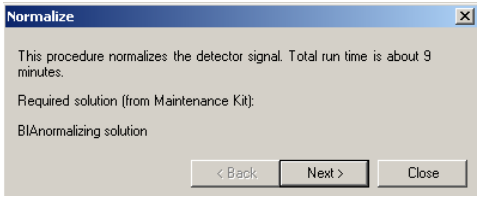
センサーチップおよびランニング緩衝液

実験に利用するセンサーチップおよびランニング緩衝液

Menu bar の **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**をクリックする。

Normalize を選択し、**Start...**をクリックする。

↓

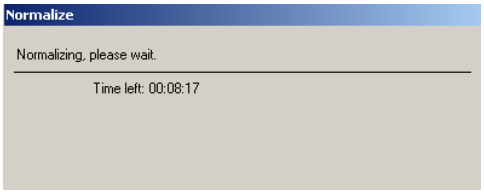

Normalize
This procedure normalizes the detector signal. Total run time is about 9 minutes.
Required solution (from Maintenance Kit):
BIAnormalizing solution
< Back
Next >
Close

Next >をクリックする。

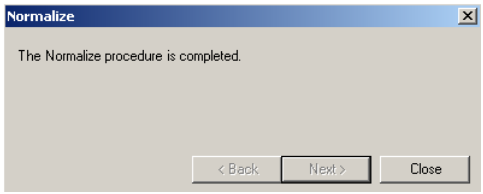
↓

バイアルをセット後、**Start** をクリックする。

↓



終了後、下記ダイアログが表示される。



自動的に **Standby flow** 状態になる。

7-3. システムチェック

装置の診断を行うプログラムである。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行する。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合等に実施する。使用頻度が高い場合、定期的に実行することを推奨する。所要時間は、約 1 時間。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAtest solution

ランニング緩衝液

HBS-N buffer 100 ml 程度　　メンテナンスキットの 10X buffer を希釈して使用

超純水

必要な消耗品

新品の Series S Sensor chip CM5

1.5 ml プラスチックバイアル

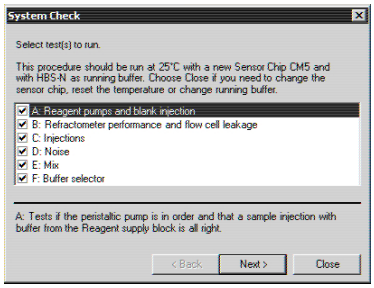
新品のセンサーチップ CM5 を Dock 後、HBS-N 緩衝液で Prime を行う。

Menu bar の **Tools** → **More Tools...**を選択する。

↓

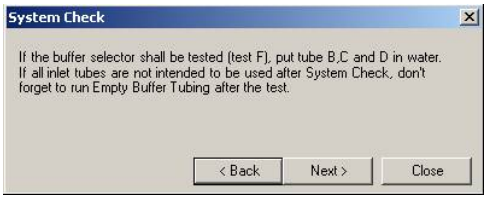
Test Tools → **System Check** を選択して **Start...**をクリックする。

↓


System Check
Select test(s) to run.
This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5 and with HBS-N as running buffer. Choose Close if you need to change the sensor chip, reset the temperature or change running buffer.
A: Reagent pumps and blank injection
B: Refractometer performance and flow cell leakage
C: Injections
D: Noise
E: Mix
F: Buffer selector
A: Tests if the peristaltic pump is in order and that a sample injection with buffer from the Reagent supply block is all right.
< Back
Next >
Close

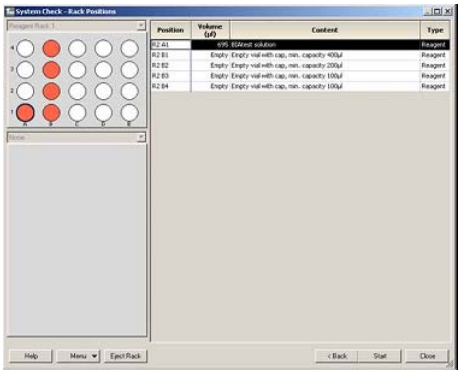
System Check ダイアログが表示される。全項目にチェックをつて、**Next >**をクリックする。Buffer scouting 機能の試験の必要がなければ、F の試験項目のチェックははずす。

↓


System Check
If the buffer selector shall be tested (test F), put tube B,C and D in water.
If all inlet tubes are not intended to be used after System Check, don't forget to run Empty Buffer Tubing after the test.
< Back
Next >
Close

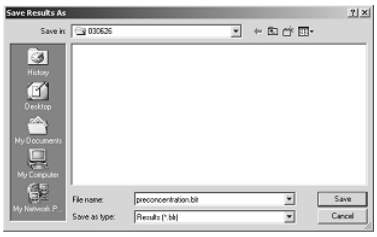
A のチューブを HBS-N buffer 10X を希釈したボトルに、B,C および D のチューブを超純水の入ったボトルに差し込む。(Buffer Scouting 機能のテストが必要なければ、B,C,D のチューブを超純水に入れる必要はない。) **Next >**をクリックする。

↓



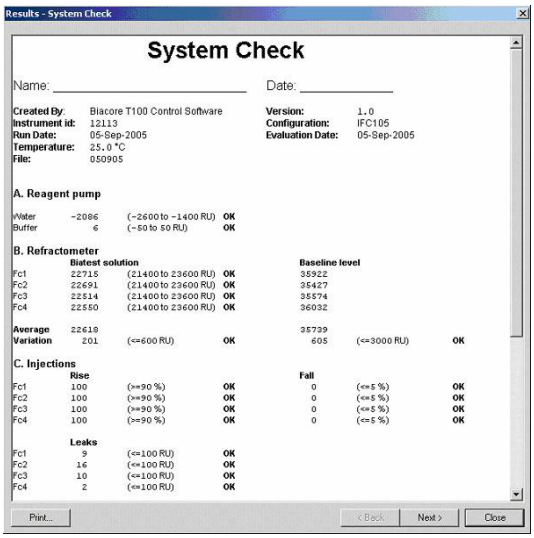
BIAtest Solutionを、1.5 mlプラスチックバイアルに695 ul分注してラックポジションにセットする。また、空の1.5 mlプラスチックバイアル4本をラックポジションにセットし、**Start**をクリックする。

↓



続いて、測定結果の保存先を指定する。**File name**を入力して、**Save**すると測定がスタートする。システムチェックを実行後、B,C および D のチューブを使用しない場合は **Empty Buffer Tubing** を実行すること。180 ページ参照。

↓



測定が終了すると、チェック結果が自動的に表示される。各チェック項目について測定値が正常値範囲内であれば“**OK**”、範囲外であれば“**BAD**”と診断される。**BAD** が表示されている項目がある場合には弊社技術サービス部に連絡する。

8. 実験の終了

実験が終了した際には、次のいずれかの方法でシステムを維持する。

スタンバイ状態で放置	4日以内に使用する場合
電源を落として終了	4日以上使用しない場合

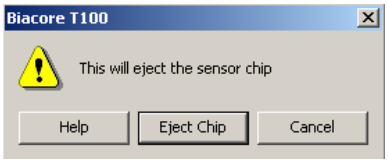
8-1. スタンバイ状態での放置

測定を終了すると自動的に **Standby flow** 状態になる。
チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、65 ml/ 24 時間の流速を最長 4 日間継続する。ランニングバッファーを涸らさないように注意する。廃液ボトルの空き容量にも注意する。
スタンバイ状態であるか否かは、**Status bar** で確認できる。

8-2. 電源の落とし方

Toolbar の **Eject** アイコン( )または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択する。

↓



Eject Chip をクリックする。

↓

センサーチップポートが開くのでセンサーチップを取り出し、メンテナンス用センサーチップをセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換する。

↓

Chip type は Maintenance を選択する。**Chip id** に Maintenance と入力する。
Dock Chip をクリックする。

↓

Dock が実行され、**Standby flow** 状態になる。
Menu bar の **Tools** → **Prime** を選択する。

↓

Prime 終了後、メンテナンス用センサーチップを取り出して Biacore T100 control software を終了する。パソコンのシャットダウン、Biacore T100 の本体電源を落とす。

8-3. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の 2 つの方法で保存する。
リガンドは保存中に変性するので、再使用の際にはポジティブコントロールサンプルのレスポンスからリガンドの活性を確認する。

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4 ℃で保存する。
安定なタンパク質を固定したセンサーチップの保存に用いる。

ウェット状態での保存

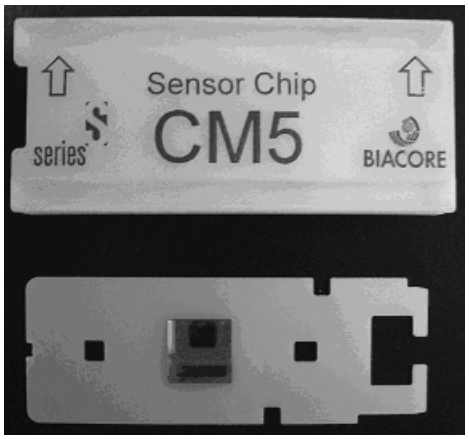
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを HBS-EP+等の緩衝液を入れた容器（50 ml 容のふたつプラスチック遠心チューブ等）に浸し、4 ℃で保存する。

シートの取り出しと保存

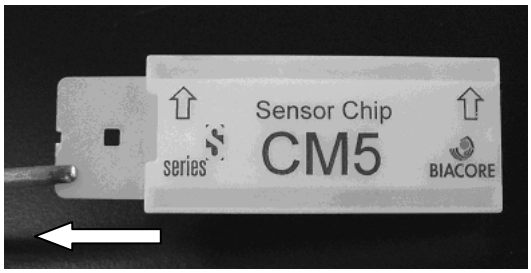
センサーチップはカバーとシートから構成されている。

カバー

シート



シートの金基板の窪んでいる面はリガンドが固定化されている。
平らな面は検出器が接触する。リガンド固定化面には触れないよう注意する。
下図のようにピンセットにてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存する。



保存していたシートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納

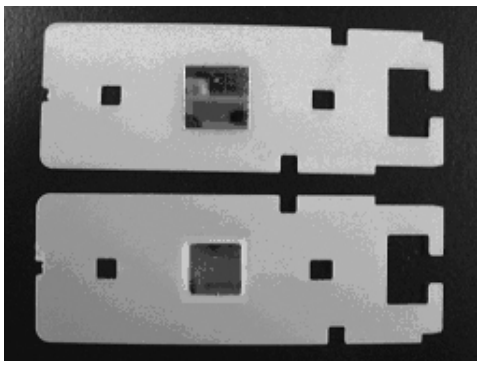
再利用する際は、緩衝液に浸していたシートをカバーに収める。シートの水分を取り除いてからカバーに収める。

プラスチックの部分 キムワイプでよく拭く。

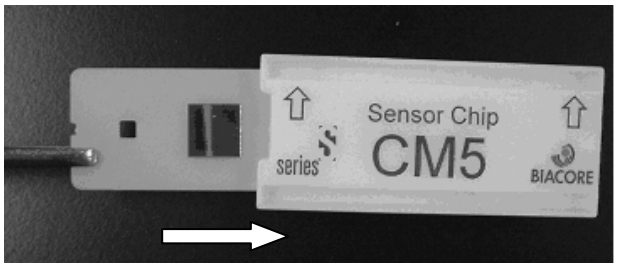
検出面	キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭く。さらに乾いたキムワイプで拭く。
固定化面	キムワイプなどを“こより状”に細くして、金基板の中央部分に触れないように、四隅から水分を吸収する。

検出面

固定化面



埃に注意しながらカバーに収める。下図のように、検出面が表になる向きで、ピンセットにてカバーの左側から挿入する。
リガンド固定化面を表にして挿入した場合には最後までシートが入らない。

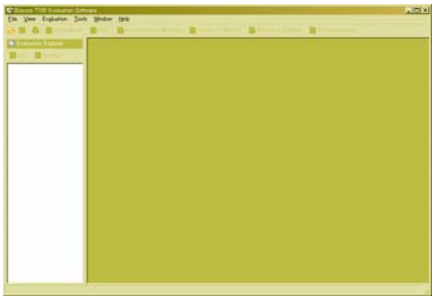


9. センサーグラムの編集

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアが自動的に立ち上がり、取得データは編集解析に向け移行される。過去に取得したデータを編集解析する場合は、Evaluation ソフトウェアを起動し、ファイルの呼び出しから行う。

9-1. ソフトウェアの起動

画面左下の **Start** → **BIAprograms** → **Biacore T100 Evaluation Software** をクリックする。



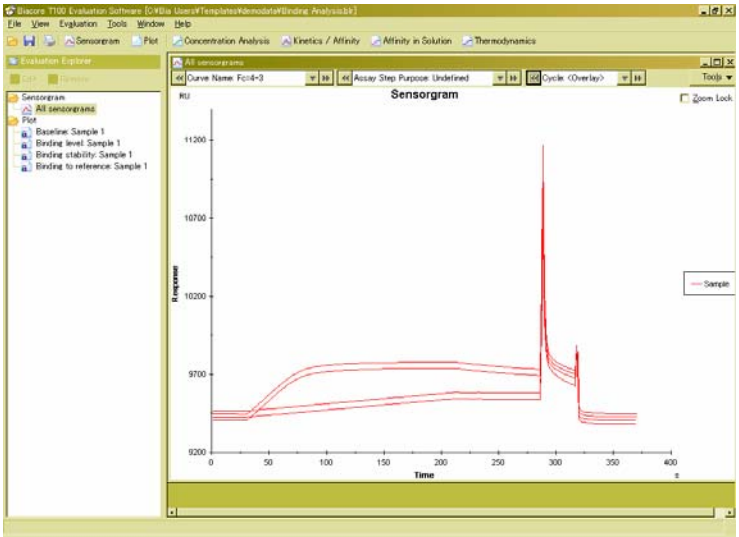
9-2. ファイルの呼び出し

アイコン( )もしくは **File** → **Open...**をクリックし、目的のファイルを選択する。(通常、ファイルは、C:/BIA users/に保存されている。)

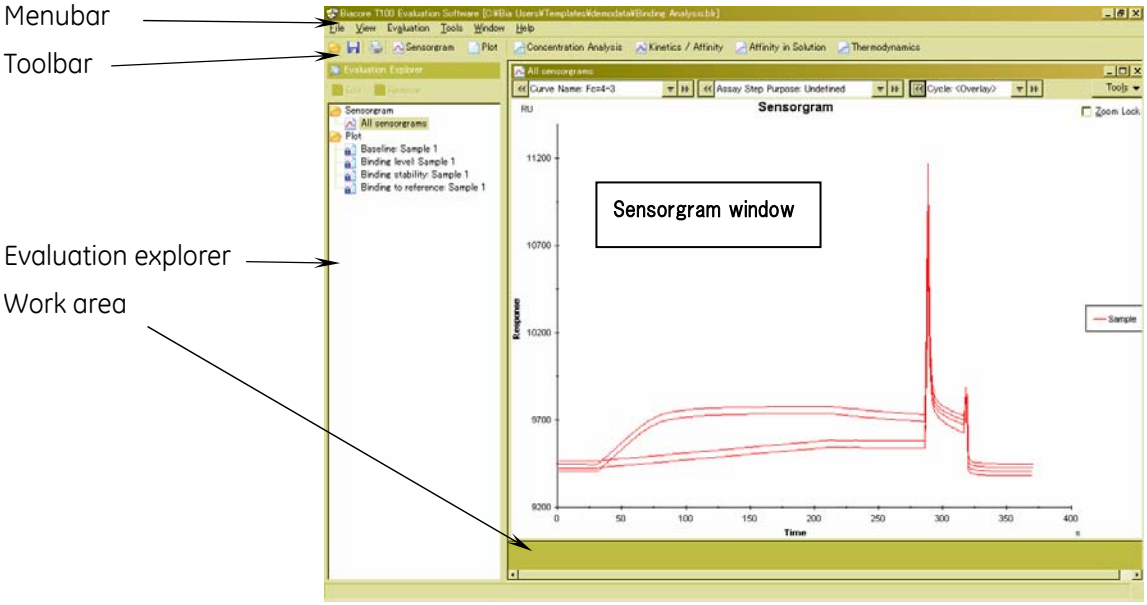
ここでは、練習用データ C:/BIA users/T100 demo file / Binding Analysis を選択する。

OK をクリックする。

↓



補足 9-1. 画面の説明



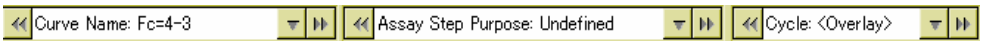
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binnding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

9-3. センサーグラムの編集

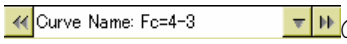
Evaluation explorer で **Sensorgram** ファイルから、**All sensorgrams** をクリックし、**Work area** 内に **Sensorgram window** を表示する。

9-3-1. センサーグラムの選択

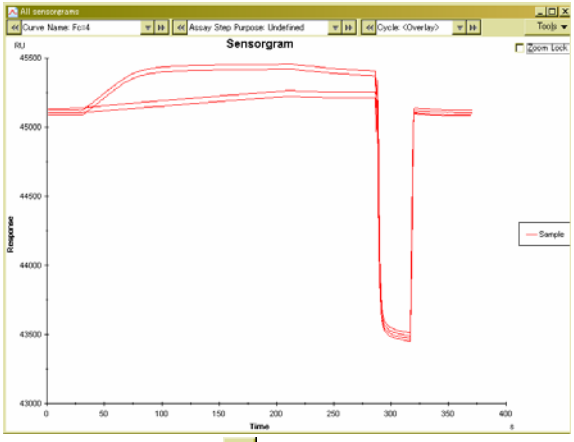
Sensorgram window 上部のセレクションツールを使用する。



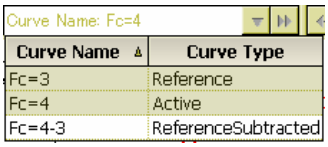
フローセル別センサーグラムの選択



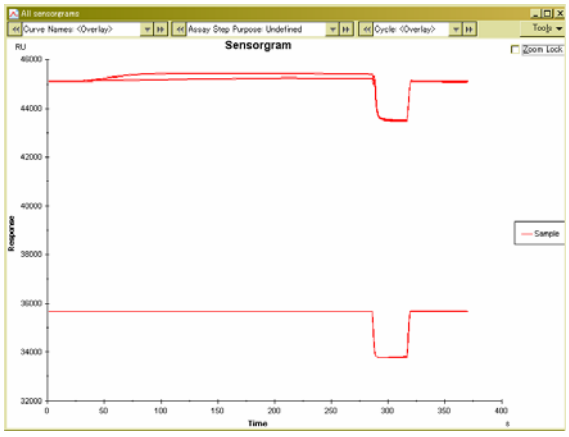
の もしくは をクリックし、目的のフローセルを選択する。



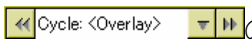
複数のフローセルを同時に選択する場合は、 を使用する。



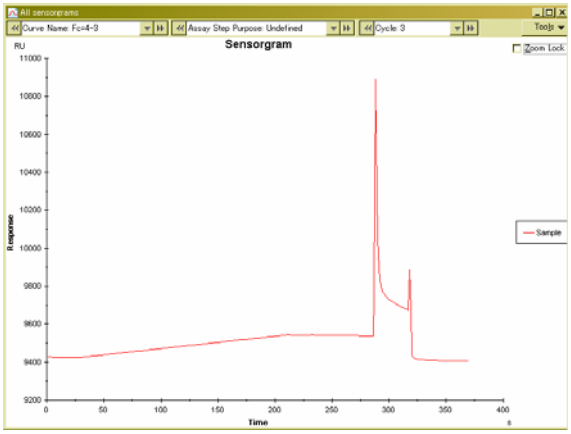
キーボードの **Ctrl** キーを押しながら、目的のフローセルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。



特定のセンサーグラムの選択

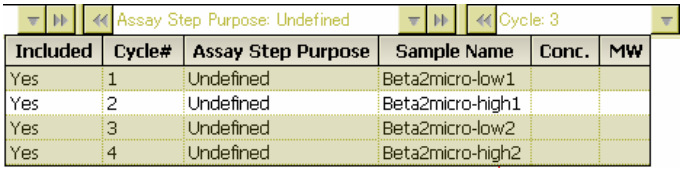


の もしくは をクリックし、目的のサイクルを選択する。



↓

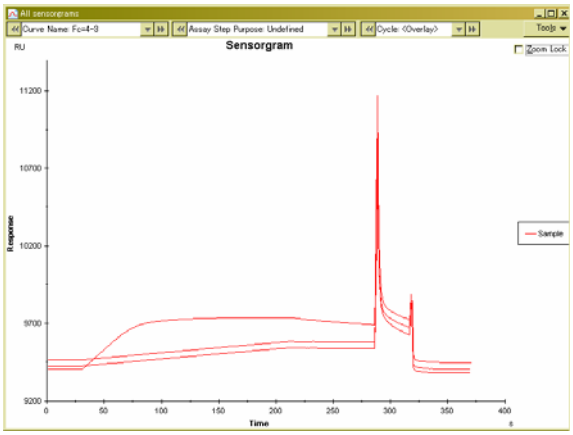
複数のサイクルを同時に選択する場合は、 を使用する。



Included	Cycle#	Assay Step Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Undefined	Beta2micro-low1		
Yes	2	Undefined	Beta2micro-high1		
Yes	3	Undefined	Beta2micro-low2		
Yes	4	Undefined	Beta2micro-high2		

キーボードの **Ctrl** キーを押しながら、目的のサイクルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

↓



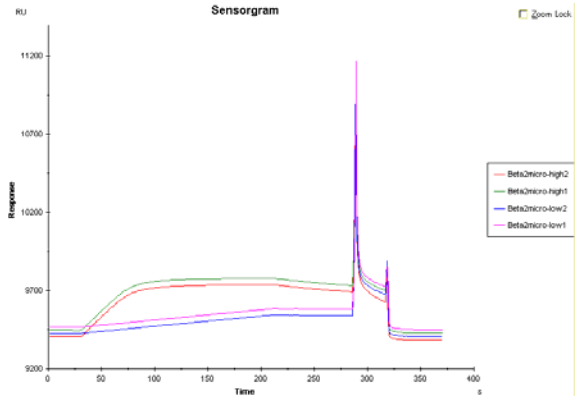
9-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用する。

色の表示の変更

Tools → **Color By** → **Sample** をクリックする。

サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更され、表示される。



その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更し表示することが可能である。

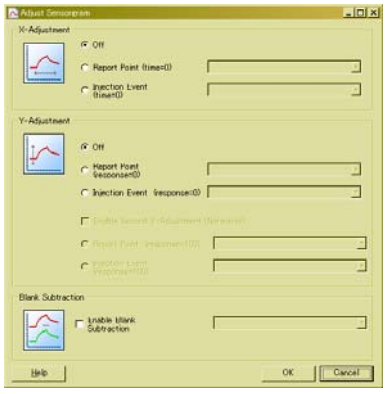
レポートポイントの表示

Tools → **Report Point** → **Id and Marker** をクリックする。

9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースライン合わせ

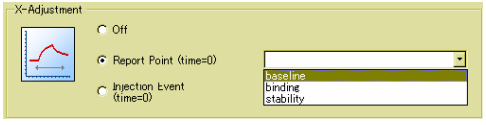
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用する。

Tools → **Sensorgram Adjustment**…をクリックする。



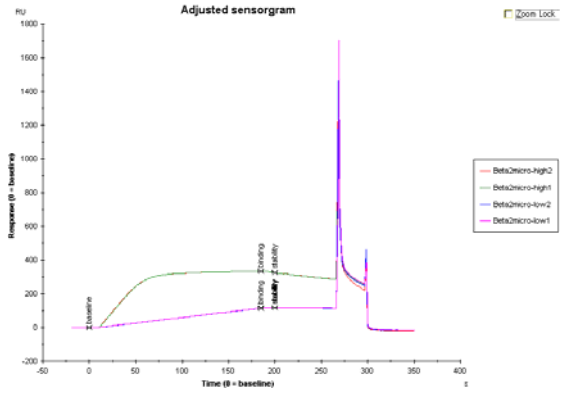
サンプル添加開始時間合わせ

X-Adjustment に **Report point (time=0)**をクリックし、▼で **baseline** を選択する。



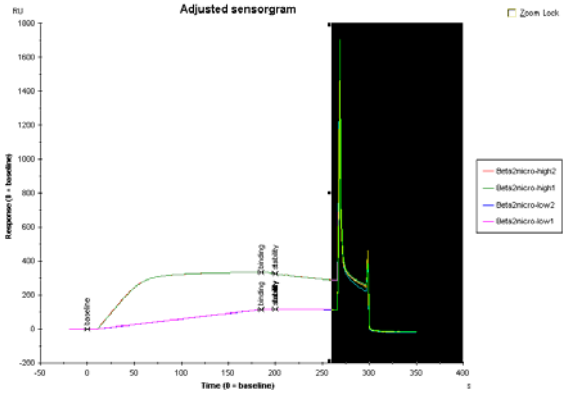
ベースライン合わせ

Y-Adjustment も同様に、**Report point (response=0)**をクリックし、▼で **baseline** を選択する。
OK をクリックする。

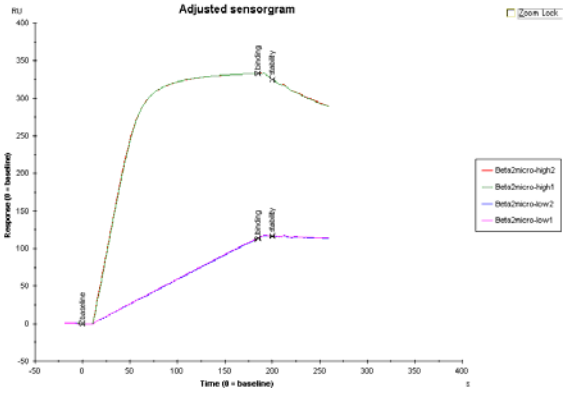


9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲を、マウスを右クリックしながらドラッグし選択する。

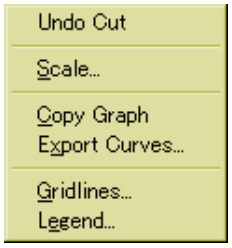


Sensorgram window 上でマウスを右クリックする。**Cut** をクリックする。



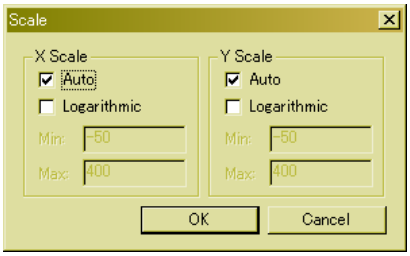
9-4. グラフの編集

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。

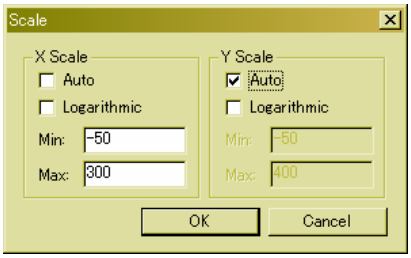


スケールの変更

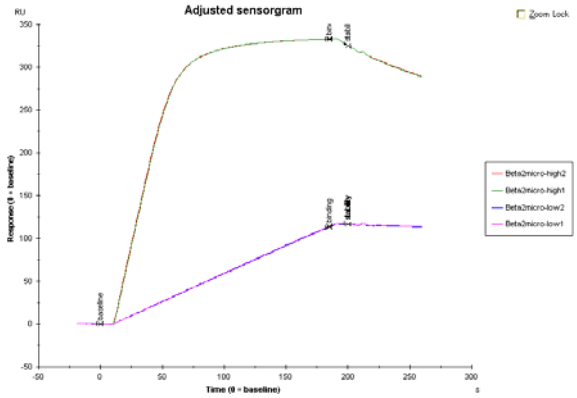
Scale…



通常 **Auto** が選択されている。スケールを変更する場合は、Auto のチェックをはずし、各軸のスケールの最小値(Min:)と最大値(Max:)を入力する。

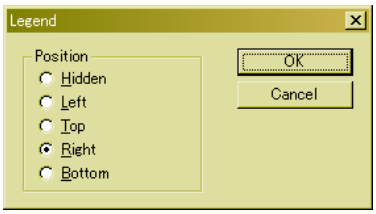


OK をクリックする。

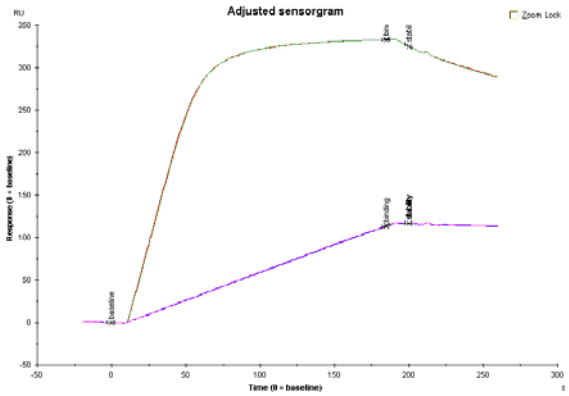


凡例の移動と削除

Legend…

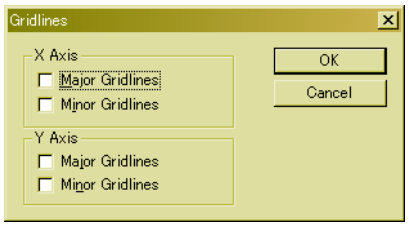


通常 **Right** が選択されている。移動する位置を選択する。凡例をグラフから削除する場合は、**Hidden** を選択する。OK をクリックする。



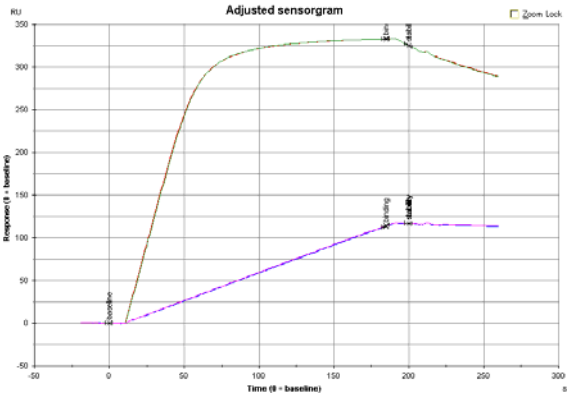
グリッドラインの入力

Gridlines…



主軸目盛に対してグリッドラインを表示させるときは、Major Gridlines にチェックを入れる。副目盛に対してグリッドラインを表示させるときは、Minor Gridlines にチェックを入れる。

OK をクリックする。



9-5. データの移管

データの移管方法には、次の方法がある。

画像データファイルとして移管

テキスト形式ファイルとして移管

Excel 形式ファイルとして移管

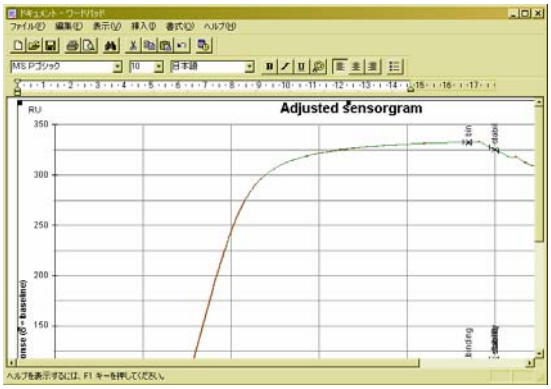
画像データファイルとして移管

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。

Copy Graph をクリックする。

グラフを画像としてコピーする。続いて Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け、貼り付けたファイルを保存する。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させることが可能となる。

（例）Word Pad への貼り付け



センサーグラムをテキスト形式ファイルとして移管

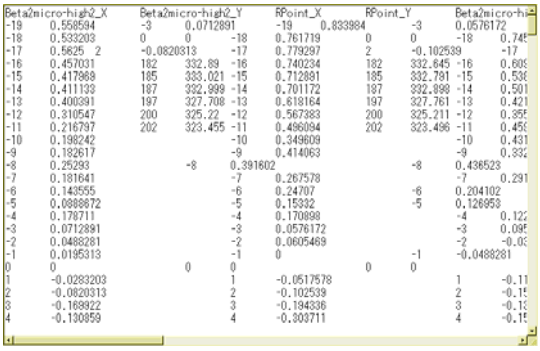
Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。

Export Curves...をクリックする。

↓

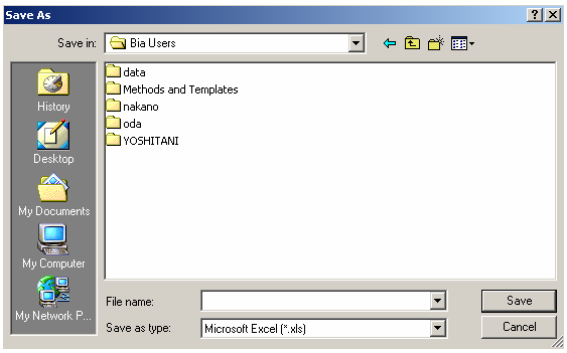
保存先を指定して保存する（拡張子：txt）。保存したファイルは、他のパソコンの Excel 等のグラフ描画機能を持つソフトウェアで再びセンサーグラムを作成することが可能である。

（例）保存した text ファイル



解析データを Excel 形式ファイルとして移管

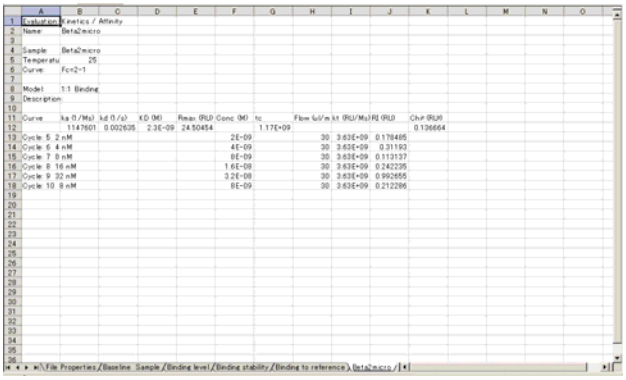
File → Export → Result To Excel...



Evaluation Explorer に表示されている解析結果の数値データなどが保存される（拡張子：xls）。ただし、センサーグラムのデータは保存されない。

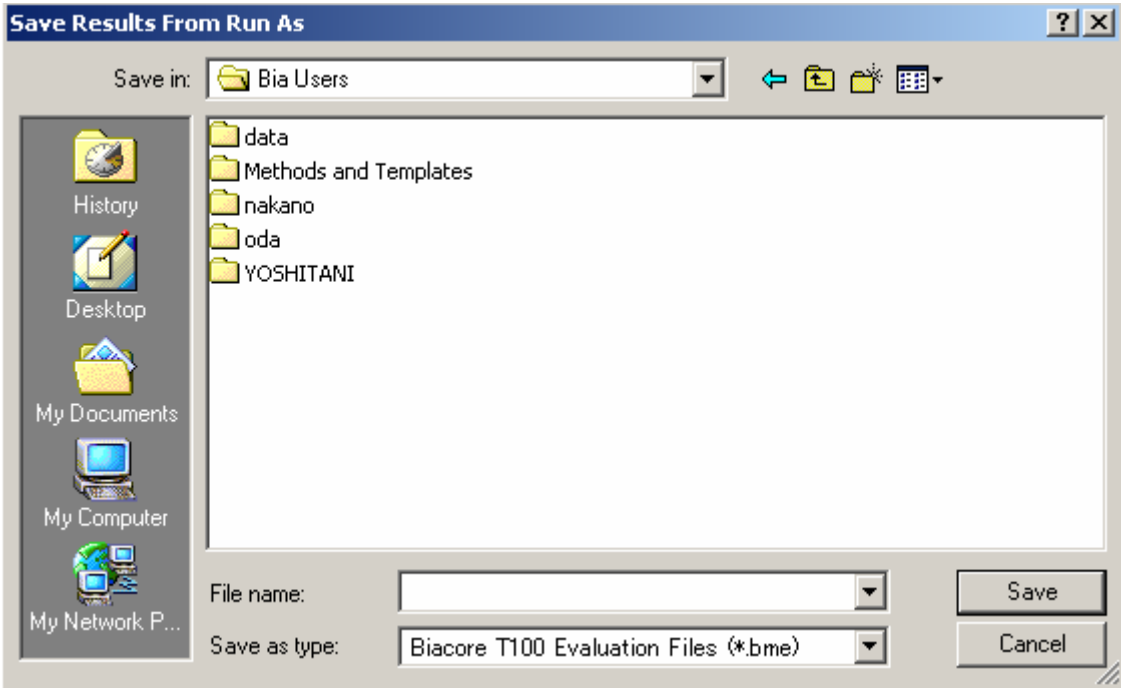
他のパソコンの Excel で解析結果を開くことができる。

（例）保存した xls ファイル



9-6. データの保存

File → **Save As**…をクリックする。



Save in:に保存先（C:/Bia Users/個人名など）を選択し、File name:にファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

補足 9-2. ファイルのアイコン

ファイルの種類によって付属のアイコンが異なる。

Biacore T100 Control ソフトウェアで保存したファイル

Biacore T100 Evaluation ソフトウェアで保存したファイル

テキスト形式で保存したデータファイル

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

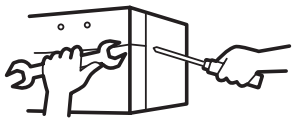
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

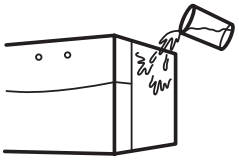
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

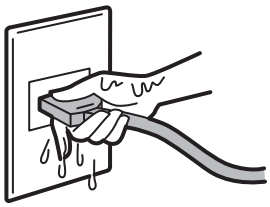
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

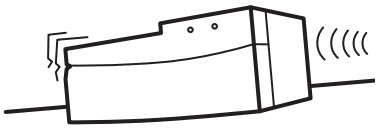
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

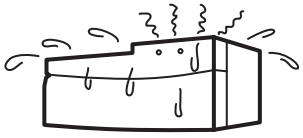
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

© 2009 GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社　〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店